

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1913-1914.

N° 14.

ÉTUDE

DE LA

Destinée du Chloralose dans l'organisme animal

et ses rapports avec la Conjugaison glycuronique

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le juillet 1914.

PAR

Maurice FRÉDOUX

PHARMACIEN DE PREMIÈRE CLASSE

ANCIEN INTERNE MÉDAILLÉ DES HÔPITAUX DE PARIS.

JURY { MM. BÉHAL, Président.
DELEPINE, Professeur.
VALEUR, Agrégé.

LONS-LÉ-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1914

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1913-1914.

N° 14.

ÉTUDE

DE LA

Destinée du Chloralose dans l'organisme animal

et ses rapports avec la Conjugaison glycuronique



THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le juillet 1914.

PAR

Maurice FRÉDOUX

PHARMACIEN DE PREMIÈRE CLASSE

ANCIEN INTERNE MÉDAILLÉ DES HÔPITAUX DE PARIS.



JURY { MM. BÉHAL, Président.
DELEPINE, Professeur.
VALEUR, Agrégé.



LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1914

PERSONNEL DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GAUTIER, Directeur, *, 🌿 I.
BOURQUELOT, Assesseur, *, 🌿 I.
E. MUSSON, Secrétaire, *, 🌿 I.

PROFESSEURS

MM. GUIGNARD, Membre de l'Institut, O. *, 🌿 I. Botanique générale.
VILLIERS, *, 🌿 I. Chimie analytique.
BOURQUELOT, *, 🌿 I. Pharmacie galénique.
GAUTIER, *, 🌿 I. Chimie minérale.
RADAIS, *, 🌿 I. Cryptogamie.
BÉHAL, O. *, 🌿 I. Chimie organique.
PERROT, *, 🌿 I. Matière médicale.
COUTIÈRE, *, 🌿 I. Zoologie.
BERTHELOT, 🌿 I. Physique.
GRIMBERT, *, 🌿 I. Chimie biologique.
MOUREU, Membre de l'Institut, *, 🌿 I. Pharmacie chimique.
LEBEAU, 🌿 I. Toxicologie.
DELÉPINE, 🌿 I. Hydrologie et Hygiène.

Directeur honoraire : M. GUIGNARD, O. *, 🌿 I.

Professeurs honoraires : MM. JUNGFLEISCH, O. *, 🌿 I.
et BOUCHARDAT, O. *, 🌿 I.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. GUERBET, 🌿 I.	MM. GUÉRIN, 🌿 I.
VALEUR, *, 🌿 A.	GUÉGUEN, 🌿 I.
BOUGAULT, 🌿 A.	LUTZ, 🌿 I.
TASSILY, 🌿 I.	HÉRISSEY, 🌿 I.

CHARGÉS DE COURS

MM. GUERBET, 🌿 I. Minéralogie.
HONNORAT, 🌿 I. Législation et Déontologie
pharmaceutiques

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, 🌿 I. Chimie générale.
COUSIN, 🌿 I. Chimie analytique.
SOUÈGES, 🌿 A. Micrographie.
MOURLOT, 🌿 I. Physique.
BARTHELAT, *, 🌿 I. Microbiologie.

Chef du Laboratoire des examens pratiques : M. JAVILLIER, 🌿 I.

Bibliothécaire en Chef : M. DORVEAUX, 🌿 I.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR A. BÉHAL,

NOMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE.

OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

Hommage respectueux.

A MONSIEUR M. TIFFENEAU,

PROFESSEUR AGRÉGÉ A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
PHARMACIEN DE L'HÔPITAL BOUCICAUT.

Témoignage de reconnaissance et de sincère dévouement.

INTRODUCTION

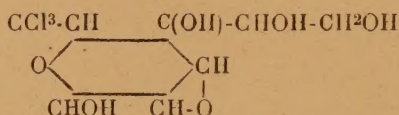
Bien que le chloralose ait conquis comme anesthésique général une place tout à fait exceptionnelle en physiologie expérimentale, il ne semble pas que le problème de sa destinée dans l'organisme ait tenté beaucoup de chercheurs.

Si séduisant déjà par lui-même, ce problème ne laisse cependant pas de prendre une ampleur toute particulière dès qu'on envisage les questions de doctrine qui s'y rattachent. Ces questions sont les unes d'ordre pharmacodynamique, les autres d'ordre biochimique.

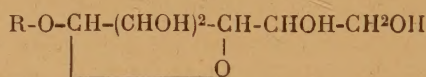
Au point de vue pharmacodynamique, il importe de savoir si les effets du chloralose doivent être attribués à sa molécule entière ou à son produit de dédoublement, le chloral. Celui-ci se transformant dans l'organisme en alcool trichloréthylque, puis par conjugaison glycuronique en acide urochloralique, il est certain que la recherche de cet acide dans les urines des animaux chloralosés permettra de décider si, dans l'organisme, le chloralose se dédouble oui ou non en chloral. Il est également intéressant de rechercher si l'élimination en nature du chloralose par l'urine peut atteindre dans certains cas, un taux suffisamment élevé pour qu'on puisse affirmer que l'action physiologique résulte bien de la fixation pure et simple de la substance sur la cellule sensible et qu'elle n'est donc pas la conséquence d'une réaction chimique s'effectuant au niveau de cette cellule.

Au point de vue biochimique, le problème de la destinée du chloralose dans l'organisme n'est pas d'une importance moindre et c'est à la solution de cette question que j'ai consacré la plus grande partie de mon travail.

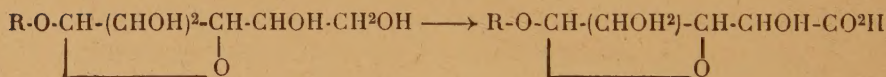
A en juger par sa structure, telle qu'elle a été établie par les travaux de HANRIOT et RICHET (1)



le chloralose devrait se comporter dans l'organisme de la même façon que les glucosides du type



Or on sait que ceux-ci sont tantôt dédoublés en leurs constituants qui subissent alors le même sort que s'ils étaient introduits directement dans l'organisme (2), tantôt ils sont oxydés par le CH²OH terminal de leur partie glucosique pour donner un composé glycuronique (3)



Cette transformation présente même une certaine importance, en ce sens qu'elle a été invoquée à l'appui de l'hypothèse faite par SUNDWIK (4), puis par E. FISCHER et

(1) HANRIOT et RICHET. — *Bull. Soc. Chim. F.* [3], 1894, t. XI, p. 37.

(2) BRAHM. — *Z. f. phys. Ch.*, (1899), t. 28, p. 439.

MUNGH, id. (1900), 29, p. 493. FALK, *Munch Woch.* 1902.

HILDEBRANDT, Berlin Kl. Woch., 1909.

(3) HILDEBRANDT. — *Beitr. z. Ch. Phys. u. Path.* (1905), 7, 450.

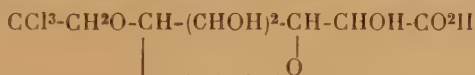
(4) Mahlys Jahresbericht, 1886, p. 76.

PILOTY (1), sur le mécanisme de la conjugaison glycuro-
nique ; d'après ces auteurs, celle-ci s'effectuerait en deux
temps : d'abord glucosidification de la copule introduite
dans l'organisme, puis oxydation du glucoside ainsi
formé.

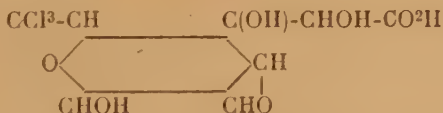
A vrai dire, la transformation relatée ci-dessus ne sau-
rait prouver que la possibilité d'un tel mécanisme, mais
non pas en démontrer la réalité.

Tout autre est, à ce point de vue, l'importance de la des-
tinée du chloralose dans l'organisme animal.

D'après ce qui se passe pour les glucosides, le chlora-
lose devrait, soit se dédoubler en glucose et chloral qui
subiraient leur destinée habituelle avec formation carac-
téristique, à partir du chloral, d'acide urochloralique



soit s'oxyder en donnant un glycuronique conjugué d'un
type spécial que, pour simplifier, j'appellerai acide chlo-
raluronique (2) :



Or, au point de vue de la démonstration du mécanisme
de la conjugaison glycuronique, cette dernière réaction, si
elle se produisait, constituerait, en faveur de l'hypothèse
de FISCHER, un argument beaucoup plus convaincant que
celui fourni par la transformation des glucosides en conju-
gués glycuroniques.

En effet, pour ces derniers, on peut toujours objecter

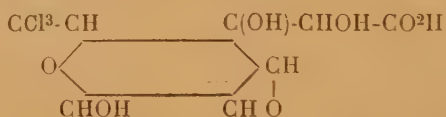
(1) FISCHER et PILOTY. — *D. chem. G.* (1891), 24, 521.

(2) De même que le glucose devient acide glycuronique, de même le
chloralose conduirait à l'acide chloraluronique.

que les glucosides ont été préalablement dédoublés en leurs composants, glucose et copule, et que celle-ci s'est ultérieurement conjuguée directement à l'acide glycuronique.

Or, une telle objection ne saurait être élevée dans le cas du chloralose, car le dédoublement de celui-ci libérerait du chloral qui, à son tour, se transformerait, comme on sait, en acide urochloralique, c'est-à-dire en un véritable conjugué glycuronique à liaison oxydique simple et non pas en un acide possédant le double enchainement qui fait la caractéristique du chloralose.

En définitive, si le chloralose se transformait, même partiellement, dans l'organisme en l'acide chloraluronique que prévoit la théorie :



l'hypothèse de FISCHER et PILOTY recevrait une confirmation éclatante.

L'importance capitale de cette démonstration n'avait pas échappé à Paul MAYER, l'un des chimistes les plus qualifiés dans l'étude de la conjugaison glycuronique. Aussi cet auteur avait-il entrepris (1) d'élucider la question de la destinée du chloralose dans l'organisme; mais les difficultés que présente cette recherche — difficultés que moi-même j'ai dû vaincre — ne lui ont pas permis de la conduire jusqu'au bout et la question restait entière quand j'entrepris l'étude de ce problème dont j'apporte aujourd'hui la solution.

Mes recherches m'ont conduit à ce résultat inattendu que, malgré son CH^2OH terminal, le chloralose ne se transforme pas dans l'organisme en acide chloraluronique;

(1) P. MAYER. — *Zeits f. Kl. med.* (1902), 47, p. 79.

La comparaison de cette formule avec celle de l'acide chloralose glycuronique, montre que le mécanisme de la conjugaison glycuronique n'est pas le même dans les deux cas puisque avec le chloralose c'est la fonction alcool primaire de la partie glucosique qui se conjugue, tandis que dans la phloridzine, où la même fonction alcool primaire se trouve en concurrence avec une fonction phénolique, c'est cette dernière qui l'emporte. Mais nous savons que c'est là une des caractéristiques de la conjugaison glycosidique et glycuronique chez les êtres vivants de s'effectuer de préférence par les fonctions phénols (1); on s'explique ainsi que le lieu où s'effectue la conjugaison puisse être différent dans le chloralose et la phloridzine.

Quoiqu'il en soit, les deux exemples que nous possédons actuellement, celui de la phloridzine et celui du chloralose montrent que dans l'organisme animal les glucosides et composés de structure analogue ne s'oxydent pas nécessairement comme ci-dessous en les acides correspondants :



Malgré toute l'importance de ces faits, je ne crois pas cependant qu'on puisse conclure au rejet de l'hypothèse de FISCHER et PILOTY : d'autant que des recherches toutes récentes de HÄMÄLÄINEN (2) ont montré qu'après introduction des glucosides dans l'organisme, on ne peut, à aucun moment, constater dans le sang la preuve d'un dédoublement des glucosides en leurs composants.

Toutefois, on peut dire que la question du mécanisme de

(1) Comme l'a montré BOURQUELOT, c'est là une différence essentielle entre la synthèse biochimique des glucosides *in vitro* et *in vivo*. *In vitro* c'est la fonction alcoolique qui l'emporte, alors qu'*in vivo*, c'est toujours la fonction phénolique qui est éthérifiée.

(2) HÄMÄLÄINEN.— *Sk. Arch. f. Phys.* (1913), 30, 187-190.

la conjugaison glycuronique n'est pas encore définitivement élucidée.

Seule, l'étude plus approfondie de la destinée dans l'organisme des différents glucosides naturels ou synthétiques permettra, quand les documents seront suffisants, de donner à cette question une solution définitive.

Avant de commencer l'exposé de mes recherches, je prie M. le Professeur BEHAL, qui m'a fait le grand honneur de présider ma thèse, de vouloir bien agréer l'hommage de mes sentiments respectueux et reconnaissants.

C'est dans le laboratoire de Physiologie du Professeur RICHET, à la Faculté de Médecine, que mes travaux ont été effectués ; qu'il me soit permis ici d'exprimer à ce maître si bienveillant, toute ma gratitude pour l'honneur qu'il m'a fait en m'accueillant dans son laboratoire et pour le vif intérêt qu'il n'a cessé de témoigner à mes recherches.

Je suis tout particulièrement heureux d'apporter à mon maître, M. TIFFENEAU, l'expression de ma vive reconnaissance ; c'est à lui que je dois l'idée de ce travail ; à lui, les conseils et les encouragements sans lesquels ma tâche n'aurait pu être menée à bien. Je lui reste attaché par la plus vive affection.

PLAN.

CHAPITRE I.

Etude de la conjugaison glycuronique dans l'organisme animal.

- § 1. Historique de la conjugaison glycuronique.
- § 2. Enumération et classement des divers glycuroniques connus.
- § 3. Destinée des glucosides.

CHAPITRE II.

Introduction du chloralose dans l'organisme animal et étude de l'élimination urinaire.

- § 1. Choix des animaux.
- § 2. Voie d'introduction.
- § 3. Protocoles des expériences.
- § 4. Dosage du chlore organique.

CHAPITRE III.

Traitement de l'urine des animaux chloralosés.

- § 1. Caractérisation d'un dérivé glycuronique.
- § 2. Isolement de ce dérivé.

CHAPITRE IV.

Constitution du conjugué glycuronique.

- § 1. Considérations théoriques.
- § 2. Dédoublément du conjugué glycuronique.
 - a) Obtention du composé à l'état de solution.
 - b) Etude des meilleures conditions d'hydrolyse.
 - c) Hydrolyse ; caractérisation du chloralose et de l'acide glycuronique.
- § 3. Destinée du chloralose dans l'organisme et ses rapports avec la conjugaison glycuronique.

Conclusions générales.

CHAPITRE PREMIER.

De la conjugaison glycuronique dans l'organisme animal.

§ 1. — Historique de la conjugaison glycuronique.

Le premier conjugué glycuronique dont la formation dans l'organisme animal ait été signalée, est l'acide urochloralique que MUSCULUS et von MERING observèrent en 1875 dans l'urine des animaux ayant absorbé du chloral (1). Trois années plus tard, JAFFÉ (2) fit une constatation analogue avec l'orthonitrotoluène et il montra que, dans ce cas, le composé éliminé par l'urine résulte de l'union d'un acide $C^6H^{10}O^7$ avec l'alcool orthonitrobenzylique provenant de la réduction, *in vivo*, du nitro-toluène.

JAFFÉ émit, en outre, l'idée que l'acide urochloralique résultait d'une combinaison analogue du chloral avec le même acide $C^6H^{10}O^7$; KÜLZ, puis von MERING (3) montrèrent enfin que c'est, non pas le chloral lui-même qui se copulait ainsi, mais son produit de réduction l'alcool trichloréthylque.

Un peu auparavant, SCHMIEDEBERG et H. MEYER (4),

(1) MUSCULUS et von MERING. — *D. ch. Ges.* (1875), 8, 662.

(2) JAFFÉ. — *Z. f. Physio. Ch.* (1878), 2, 47.

(3) von MERING. — *Id.*, (1882), 6, 480.

(4) SCHMIEDEBERG et H. MEYER. — *Id.* (1879), 3, 422,

étudiant le problème de la destinée du camphre dans l'organisme, avaient montré qu'après réduction en alcool correspondant, celui-ci se conjugue au même acide $C^6H^{10}O^7$ déjà signalé, acide qu'ils caractérisèrent comme acide glycuronique.

La conjugaison glycuronique était désormais établie. Etudiée sur un grand nombre de composés appartenant aux séries chimiques les plus diverses, elle fut bientôt reconnue comme constituant l'un des mécanismes physiologiques de l'élimination de produits normaux de l'organisme tels que phénols, scatol, indol, etc., etc. Les glycuroniques correspondants furent, en effet, caractérisés non seulement dans l'urine (1), mais encore dans le sang (2) de l'homme et des animaux.

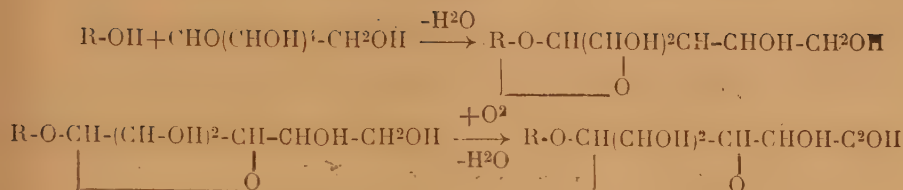
Plus récemment, en 1905, NEUBERG et NEIMANN réalisèrent la synthèse d'un glycuronique conjugué, l'acide phénylglycuronique, par action du phénol potassé sur l'acide diacétylbromoglycuronique (3).

En même temps furent codifiées, peu à peu, les règles de la conjugaison glycuronique ; on démontra que la copule doit, pour se conjuguer, posséder au moins un oxhydrile alcoolique ou phénolique ; ce n'est qu'après un phénomène préalable d'oxydation ou de réduction, *in vivo*, que les molécules sans oxhydriles peuvent devenir aptes à la conjugaison glycuronique. D'autre part, l'absence d'acide glycuronique libre dans l'organisme animal, ainsi que la difficulté de concevoir une oxydation du CH^2OH du glucose en acide glycuronique, ont conduit SUNDWICK, puis FISCHER et PILOTY, à admettre que la conjugaison s'effectue en deux temps : la copule, apte à la conjugaison, se combinerait au glucose pour former un glucoside β qui s'oxyderait ensuite en conjugué glycuronique.

(1) H. MEYER et NEUBERG. — *Z. f. physiol. Ch.* (1900), 29, 256.

(2) H. MEYER. — *Id.* (1901), 32, 518.

(3) NEUBERG et NEIMANN. — *Id.* (1905), 44, 114.



On voit que cette théorie implique que les glucosides doivent se transformer dans l'organisme en acides correspondants.

A la fin de ce chapitre, cette question de la destinée des glucosides sera spécialement étudiée ; elle est, en effet, liée à celle du chloralose dont la structure est si voisine.

Dans les pages qui suivent, j'examinerai tous les conjugués glycuroniques connus ; un tel inventaire avait déjà été entrepris par NEUBERG en 1904 (1) ; j'ai complété le travail de mon prédécesseur et j'ai apporté quelques légères modifications au classement adopté par lui.

§ 2. — Enumération et classement des divers conjugués glycuropiques connus.

Série aliphatique.

1. Alcools.

a) *Alcools saturés.* — Alcool éthylique jusqu'à l'alcool octylique (2), triméthylcarbinol, alcool trichloréthylique (3), méthyl propylcarbinol (4).

b) *Alcools non saturés.* — Nérol (5).

c) *Glycols.* — Glycol propylénique (6), pinacone.

(1) NEUBERG. — *Ergebnisse der Physiologie* (1904), III, 1, p. 433-435 ; voir également NEUBERG in *Bioch. Handlex.* (1911), t. II, 521-536.

(2) NEUBAUER. — *A. e P.* (1901), 46, 133.

(3) THIERFELDER et MERING. — *Z. für physiol. Ch.*, 9 (1885), 512.

(4) MAGNUS-LÉVY. — *Bioch. Zeit.* (1907), 2, 330.

(5) HILDEBRANDT. — *Beitr. z. chem. P. et Pathol.*, 4, 251.

(6) MIURA. — *Bioch. Zeit.*, 36, 25 (1911).

2. Aldéhydes.

a) **Aldéhydes saturés.** — Aldéhyde isovalérianique, chloral, butylchloral (1) et bromal (2).

b) **Aldéhydes non saturés.** — β -citral (3).

3. Acétones.

a) **Acétones saturés.** — Acétone et homologues (NEUBAUER), Dichloracétone (SUNDWIK).

b) **Cétones non saturés.** — Oxyde de mésitylène.

c) **Dicétones.** — Acétylacétone (NEUBAUER).

Série aromatique.

1. Hydrocarbures benzéniques et dérivés.

a) **Carbure benzéniques et homologues.** — Benzène (4), Toluène et xylène (SUNDWIK), Ethylbenzène (NEUBAUER), Isopropylbenzène (5), Métacymène (6).

b) **Carbures à chaîne latérale non saturée.** — Styrolène (NEUBAUER).

c) **Dérivés nitrés.** — Nitrobenzène et homologues (7), orthonitrotoluène (8).

d) **Dérivés halogénés.** — Dérivés de substitution des carbures benzéniques (NEUBAUER).

(1) MUSCULUS et MÉRING. — *D. chem. Ges.*, 8 (1875), 662.

(2) MARALDI. — *Boll. chim. farm.*, 42 (1903), 81.

(3) HILDEBRANDT. — *Zeit. f. physio. Ch.*, 12, 295.

(4) SCHMIEDEBERG. — *Arch. e. Pathol.*, 14 (1881), 307.

(5) HILDEBRANDT. — *Zeit. f. physio. Ch.*, 36, 452.

(6) HILDEBRANDT. — *Id.*, 36, 482.

(7) JAFFÉ. — *Id.*, 3, 47, *D. ch. Ges.*, 12, 1092.

(8) JAFFÉ. — *Zeit. f. ph. Ch.*, (1878-1879), 2, 47. — MEYER, *id.*, 46, 497 (1906).

2. Phénols.

a) *Phénols monoatomiques et leurs dérivés.* — Phénol (formule de KÜLZ rectifiée par SALKOWSKI et NEUBERG (1), p. Cresol (2), Thymol (3), Carvacrol (HILDEBRANDT).

b) *Diphénols.* — Résorcine, hydroquinone (4), Orcine (5).

c) *Phénols-éthers.* — Anisol, Phénétol (6).

d) *Phénols nitrés et halogénés.* — Dérivés substitués, nitrés, halogénés et aminés (NEUBAUER).

3. Alcools aromatiques.

Alcool benzylique (7). Alcool phénol : Thymol méthanol (8).

4. Aldéhydes et oxyaldéhydes.

Benzaldéhyde (MERING), Vanilline (9), Aldéhyde syringique (10).

5. Cétones et oxycétones.

Acétophénone (NEUBAUER). Résacétophénone et oxypropionophénone (11). Gallacétophénone (KEKOWSKI).

6. Acides.

Acide o-nitrophénylpropionique (12).

- (1) SALKOWSKY et NEUBERG. — *Bioch. Zeit.*, 2, 307.
- (2) NEUBERG et KRETSCHMER. — *Bioch. Zeit.*, 36, 13.
- (3) BLUM. — *Zeit. f. Physio. Ch.*, 16, 214.
- (4) KÜLZ. — *Zeit. f. Biol.* (1898), 27, 248.
- (5) YOSHITA SERA. — *Zeit. f. Physio. Ch.*, 88, 460.
- (6) KOSSEL. — *Zeit. f. Physio. Ch.* (1880), 4, 296.
- (7) SCHMIEDEBERG. — *Arch. f. exp. Pathol.*, 1881, 14, 291.
- (8) HILDEBRANDT. — *D. chem. Ges.* (1904), 37, 4456.
- (9) KOTAKE. — *Zeit. f. physio. Ch.*, 45, 320. — PREUSSE, id., 4, 213.
- (10) KOTAKE. — Id., 45, 320.
- (11) NENKI D. — 27, 2732.
- (12) G. HOPPE-SEYLER. — *Zeit. f. physio. Ch.*, 7, 178.

7. Amines et dérivés azotés.

a) *Amines*.— Aniline (1). Acétanilide et acétotoluide (2). Phénétidine (MULLER).

b) *Azoïques*.— Azobenzène (KÜLZ).

c) *Hydrazoïques*.— Hydrazobenzène (KÜLZ).

Série Hydroaromatique.

1. Hydrocarbures.

Camphane $C^{10}H^{18}$ (3). Camphène et Phellandrène (4, 5). Sabinène (5, 6). Limonène, Menthène (7). Nopinène (8), Pinène (9).

2. Alcools.

a) *Alcool en C⁹*.— Camphénitol $C^9H^{16}O$ (10), α -Santenol et β -Santenol (11).

b) *Alcools en C¹⁰*.— Bornéol droit $C^{10}H^{17}OH$ (12, 13), Bornéol gauche (13, 14), Bornéolracémique (15), Isobornéol (16),

(1) KÜLZ.— *Brat. Zeit. f. K. Méd.*, 42.

(2) JAFFÉ et HILDEBERT.— *Zeit. f. physio. Ch.*, 12, 295.

(3) HÄMÄLÄINEN.— *Skand. Arch.*, 27, 197-200.

(4) FROMM et HILDEBRANDT.— *Zeit. f. physio. Ch.*, 33, 579.

(5) — — — *Id.*, 37, 189.

(6) — — — *Id.*, 33, 592. — HÄMÄLÄINEN, *Skand.*

Arch. (1912), 27, 187-191.

(7) FROMM et HILDEBRANDT.— 37, 155-162. — NEUBAUER, *Arch. f. exp. Path. u. Physio.* (1901), 46, 152.

(8) HÄMÄLÄINEN.— *Skand. Arch.*, 27, 195-197.

(9) — — — 27, 192-195.

(10) — — — 27, 207-208.

(11) — — — 27, 211-215 et 215-217.

(12) FROMM et CLEMENS.— *Zeit. f. physio. Ch.*, 36, 441.

PELLACANI.— *Arch. f. exp. Path.* (1901), 45, 110.

(13) HÄMÄLÄINEN.— *Skand. Arch. f. Physio.*, 23, 86.

MAGNUS LÉVY.— *Bioch. Zeit.*, 2, 319-331.

(14) — — — 2, 319.

Cyclogéraniol (1), Dihydrocarvéol $C^{10}H^{17}OH$ (2), Fenchol gauche $C^{10}H^{17}OH$ (3), Isofenchol (3), Menthol (4), Nérol (1), Rhododendrol (5), Sabinol $C^{10}H^{16}O$ (6), Terpinéol $C^{10}H^{18}O$ (7), Thymol $C^{10}H^{18}O$ (8), Hydrate de camphène (9).

c) *Glycols*.— Hydrate de terpine (10).

d) *Oxyde interne*.— Cinéol (Eucalyptol) (11).

e) *Alcools sesquiterpéniques*.— Santalol (12).

3. Aldéhydes et Cétones.

a) *Cétones en C^9* . — Camphénilone $C^9H^{14}O$ (13), Santénone $C^9H^{14}O$ (14).

b) *Cétones en C^{10}* .— Camphre (15), Camphre gauche (16),

- (1) HILDEBRANDT.— *B. Z. Ch. Phy. u. Path.*, 4, 251.
- (2) HÄMÄLÄINEN.— *Skand. Arch.*, 27, 162-165.
- (3) — 27, 200-204 et 205-206.
- (4) PELLACANI.— *Arch. f. exp. Path.*, (1883), 17, 390.
FROMM et CLEMENS.— *B. Z. Ch. Phys. u. Path.*, 1, (1902), 304.
NEUBERG et LACHMANN.— *Bioch. Zeit.*, 24, 416 (1910).
- (5) ARCHANGELSKI.— *Arch. f. exp. Pathol.*, 46, (1901), 313.
- (6) HILDEBRANDT.— *Zeit. f. phys. Ch.*, 36, 441. — FROMM, id., 41, 243.
HÄMÄLÄINEN.— *Skand. Arch. f. Phys.*, 1912, 27, 182-187.
- (7) — *Bioch. Zeit.*, 50, 220
MATZEL, *Arch. int Pharm.*, 1905, 14, 331.
- (8) HÄMÄLÄINEN.— *Skand. Arch.*, 1912, 27, 180-182.
- (9) — 27, 219-221.
- (10) — 27, 165-169.
MATZEL, *Arch. int Pharm.*, 1905, 14, 345.
- (11) HÄMÄLÄINEN. — 24, 1.
- (12) HILDEBRANDT.— *Zeit. f. Phys.*, 36, 441. — CARO, *Arch. f. c. Path.*, 46.
- (13) HÄMÄLÄINEN.— *Skand. Arch.*, 1912, 27, 209-210.
- (14) — 217-219.
- (15) SCHMIEDEBERG et P. MAYER.— *Zeit. f. Ch.*, 3, (1879), 422.
- (16) MAGNUS LÉVY.— *Bioch. Zeit.*, 2, 319.
HÄMÄLÄINEN, *Skand. Arch.*, (1910), 23, 299.

Camphre inactif (1), Carvone $C^{10}H^{18}O$ (2), Fenchone $C^{10}H^{16}O$ (3), Oxycamphre (4), Menthone $C^{10}H^{16}O$ (5), Thuyone $C^{10}H^{16}O$ (5, 6), Pulégone $C^{10}H^{16}O$ (7).

c) *Aldéhydes*.— Cyclocitral (8).

d) *Acides alcools*. — Sanatol (HILDEBRANDT, 1902).

Combinaisons diverses.

a) *Dérivés naphtaléniques*.— Naphtol (9), Naphtalène (10), Phénanthrène (11).

b) *Groupe pipéridinique*.— Thymotinpipéridine (12).

c) *Groupe de l'indol*.— Indol (13), Scatol (14).

d) *Groupe quinoléique*. — o-Oxyquinoléine (15), Carbostryrile (16), Hydrate d'éthylquinoléinium (MERING).

e) *Groupe du Pyrazol*. — Antipyrine (17).

(1) P. MAYER.— *Bioch. Zeit.*, 9, 439. — HÄMÄLÄINEN, *Sk. Arch.*, 23, 97.

(2) HILDEBRANDT.— *Zeit. f. ph. Ch.*, (1902), 36, 441-457.

(3) RIMINI.— *Acc. Lincei Roma*, [5], 10, (1901), 244.

(4) HÄMÄLÄINEN.— *Skand. Arch.*, (1910), 23, 299.

(5) NEUBAUER.— *Arch. f. exp. Path. u. Ph.*, (1901), 46, 152.

HILDEBRANDT.— *Zeit. f. Physio. Ch.*, 37, 188.

(6) HÄMÄLÄINEN.— *Skand. Arch.*, (1912), 27, 174-180.

— (1912), 27, 169-174.

FROMM et HILDEBRANDT.— *Zeit. f. ph. Ch.*, (1901), 33, 594.

(7) HILDEBRANDT.— *Id.*, (1902), 36, 456.

(8) — *Arch. exp. Path.*, (1901), 46, 266.

(9) NENKIE et LESNITZ.— *D.*, 19, 1534.

(10) EDLEFSON.— *Verh. des VII Kong. f. inn. Med.*, Wiesbaden, 1888.

(11) PSCHORR et BERGELL.— *Zeit. f. phys. Ch.*, 38, 16, (1903).

(12) HILDEBRANDT.— *Arch. f. exp. Patho.*, 44, 278.

(13) KÜLZ, WANG.— *Zeit. f. Physio. Ch.*, 27, (1899), 557.

(14) MESTER.— *Pflüg. Arch.*, 30, 484.

(15) BRAHM.— *Zeit. f. Physio. Ch.*, 28, 439.

(16) FENYVESSEN.— *Zeit. f. Physio. Ch.*, 30, 552.

(17) LAWROW.— *D. chem. Ges.*, 33, 2845.

f) *Groupe euxanthique.* — Euxanthone (1, 2, 3).

g) *Groupe de la morphine.* — Morphine (4).

§ 3. — Destinée des glucosides dans l'organisme animal.

Les divers glucosides ne paraissent pas avoir, dans l'organisme animal, une destinée uniforme.

On peut les diviser, à ce point de vue, en deux groupes, suivant que les produits d'élimination ont conservé ou non l'enchaînement glucosidique.

a) *Glucosides dont les produits d'élimination n'ont plus d'enchaînement glucosidique.* — Dans ce groupe rentrent, tout d'abord, les α et β méthylglucosides ; ceux-ci sont vraisemblablement dédoublés et la copule (alcool méthylique) subit son sort habituel, c'est-à-dire oxydation et non pas conjugaison ; il y a cependant lieu de noter que le β donne lieu à de la glycosurie (5) et qu'il produit une substance qui est réductrice après hydrolyse (6). Le benzylglucoside est également dédoublé et la copule s'oxyde, puis s'élimine à l'état d'acide hippurique (7) ; il en serait de même de la salicine (8).

b) *Glucosides dont les produits d'élimination ont conservé l'enchaînement glucosidique.* — HILDEBRANDT a, le premier, montré que divers glucosides naturels

(1) KOSTANECKI.— *D. ch. Ges.*, 19, 2918.

(2) P. MAYER.— *Zeit. f. Klin. Méd.*, 47 (1902), 14.

(3) NEUBERG et NEIMANN.— *Zeit. f. physio. Ch.* (1905), 44, 144.

(4) MERING et P. MAYER. — *Bert. Klin. Woch.*, 27 et 28 (1899).

(5) MUNCH. *Z. f. phys. Chim.* (1900), 29, 493.

(6) BRAHM.— *id.* 1899, 28, 439.

(7) FALCK.— *Münch. med. Woch.*, 1902, n° 36.

(8) HILDEBRANDT.— *D. med. Woch.*, 36, 23.

(syringine et coniférine) (1), ou synthétiques (Bornéol glucoside) (2), s'éliminent à l'état de glycuroniques.

HÄMÄLÄINEN a obtenu les mêmes résultats avec d'autres glucosides synthétiques (3). Il a de plus montré que, chez le lapin, après introduction de ces glucosides par voie sous-cutanée, on peut bientôt constater la présence de ceux-ci dans le sang, mais non point la copule libre qui proviendrait de leur dédoublement, alors que déjà l'urine recueillie par sondage contient les glycuroniques correspondants (4).

On pourrait sans doute objecter que l'absence de copule libre n'implique pas nécessairement le non dédoublement du glucoside, car il ne serait pas impossible que cette copule puisse se conjuguer aussi tôt libérée. Néanmoins, ces expériences sont nettement en faveur de l'hypothèse de SUNDWICK-FISCHER et PILOTY.

Toutefois, les glucosides ne se comportent pas tous comme ceux que nous venons de voir. La phloridzine, bien que possédant une structure analogue à celle des autres glucosides, ne se transforme pas en acide glycuronique à même nombre d'atomes de carbone ; elle conserve intacte sa chaîne glucosidique et se combine, par une de ses fonctions phénols, à une molécule d'acide glycuronique, donnant ainsi un conjugué glycuronique en C²⁷ et non en C²⁴ comme la phloridzine.

Cette particularité de la phloridzine n'est certes pas en faveur de l'hypothèse de SUNDWICK-FISCHER. Il est vrai qu'on peut toujours la considérer comme un cas exceptionnel dont la cause nous échappe ; mais, il convient

(1) HILDEBRANDT. — *Beitr. z. Ch. Phys. und Pathol.*, 1905, T. 7, page 450 ; dans le cas de ces glucosides, il y a en outre oxydation de la chaîne latérale non saturée et transformation de celle-ci en le groupe aldéhydrique CHO.

(2) HILDEBRANDT. — *Bioch. Zeit.*, 21, 1-4, 1909.

(3) HÄMÄLÄINEN. — *Sk. Arch. f. Physiol.* (1909), 23-92 ; 1912, 27, 141, 201, Les glycuroniques ainsi obtenus ont été signalés dans l'énumération ci-dessus.

(4) HÄMÄLÄINEN. — *Id.*, 1913, 30, 187-199.

de reconnaître qu'elle pourrait aussi être interprétée comme représentant le mécanisme normal des glucosides qui ne seraient pas dédoublés dans l'organisme et dont la conjugaison, par conséquent, ne pourrait se faire entre copule libre et acide glycuronique, mais seulement entre glucoside et acide glycuronique.

Nous verrons qu'il en est ainsi pour le chloralose. Celui-ci n'est pas dédoublé dans l'organisme ; aussi se conjugue-t-il directement pour donner un composé à 6 atomes de carbone de plus, l'acide chloralose glycuronique, dont l'étude fera l'objet du Chapitre IV.

CHAPITRE II.

Mode d'introduction du chloralose dans l'organisme animal. — Etude de l'élimination urinaire.

§ 1. — Choix de l'animal.

C'est exclusivement sur le chien que j'ai effectué mes expériences. On sait cependant que, dans la majorité des cas, les auteurs qui se sont occupés de la conjugaison glycuronique ont pris le lapin comme sujet d'expérience. L'aptitude de cet animal à effectuer une telle conjugaison est, en effet, beaucoup plus grande que chez le chien, et elle suffit à compenser largement, vis-à-vis de ce dernier, l'inconvénient résultant d'une moindre quantité d'urine. Toutefois, dans la cas du chloralose, le lapin s'est montré peu résistant; les doses de 8 à 10 cg. par kilo, que le chien supporte parfaitement, aussi bien par la voie veineuse que par la voie intrapéritonéale, sont mortelles pour le lapin, tout au moins par cette dernière voie. Le centre respiratoire de cet animal paraît particulièrement sensible au chloralose; la respiration se ralentit progressivement et la mort survient par arrêt respiratoire, au bout de 30 à 60 minutes.

Enfin, dans plusieurs cas non asphyxiques, j'ai vu appa-

raître du glucose dans l'urine des lapins traités. J'ai donc renoncé à employer cet animal.

D'ailleurs, P. MAYER, dont je tenais à reproduire le mode opératoire, a également utilisé exclusivement le chien. En fait, cet animal supporte très bien le chloralose. Comme l'avait déjà montré le Professeur RICHER, on peut administrer quotidiennement, soit avec les aliments, soit comme je l'ai fait avec la sonde œsophagienne, des quantités de chloralose allant jusqu'à 0 gr.,30 par kilo.

Cependant, comme en témoignent les expériences IV, V, VI, VII, VIII, il est des cas assez fréquents de susceptibilité individuelle vis-à-vis du chloralose ; tantôt l'animal est trouvé mort le jour qui suit la 1^{re} ou la 2^e ingestion, tantôt il maigrit, refuse tout aliment, et l'expérience doit être arrêtée. En ce qui concerne la conjugaison glycuronique, les particularités individuelles sont encore plus frappantes ; tandis que certains chiens se montrent excellents à ce point de vue, d'autres ne conjuguent que de très petites quantités de substance (exp. IX et X) et, dans ce cas, le chloralose est éliminé en nature. Chez le chien de l'expérience IX et X, l'inaptitude à former des conjugués glycuroniques ne s'applique d'ailleurs pas seulement au chloralose, mais à d'autres composés qui, d'ordinaire, se prêtent bien à la conjugaison, un tel fait ne paraît pas avoir été jusqu'ici mis en évidence ; il montre que la recherche des conjugués glycuroniques, après administration d'une substance quelconque, doit être effectuée sur plusieurs animaux ; enfin, il en résulte que la mesure de l'aptitude d'une substance à se conjuguer ne peut être déduite que d'une étude comparative faite sur le même chien avec une autre substance ; encore convient-il de n'accepter de tels résultats qu'avec la plus grande réserve.

§ 2. — Mode d'administration du chloralose.

On sait que, pour obtenir, chez le lapin, un rendement maximum en conjugué glycuronique, il n'est pas indifférent d'administrer la copule par telle ou telle voie ; en général, l'injection sous-cutanée fournit les meilleurs rendements ; l'injection buccale est également avantageuse. La voie intraveineuse est, par contre, beaucoup moins efficace. J'ai eu recours, chez le chien, à l'ingestion par la sonde œsophagienne ; le peu de solubilité du chloralose dans l'eau m'interdisait, en effet, l'injection sous-cutanée, à cause du trop grand volume de liquide qu'il aurait fallu injecter. Voici comment j'ai procédé :

Pour que l'effet anesthésique du chloralose se confondit autant que possible avec le sommeil normal de la nuit, la substance était administrée chaque fois à la fin de la journée, c'est à-dire vers 6 heures du soir ; l'animal pouvait ainsi continuer à prendre ses deux repas du matin et de midi. Le chloralose étant dissous dans environ 60 à 80 fois son poids d'eau chaude, on introduit la solution encore tiède par la sonde œsophagienne ; l'animal est ensuite conservé une dizaine de minutes au laboratoire dans le but d'éviter que les vomissements qui se produisent, très rarement il est vrai, quelques minutes après l'ingestion ne viennent introduire dans l'urine le chloralose du contenu stomacal.

Les urines sont recueillies tous les matins et soumises presque aussitôt au traitement plombique. L'examen polarimétrique a été fait soit après ce traitement, soit après décoloration au noir animal. Dans certains cas, le chlore organique a été dosé ; après administration par la voie œsophagienne, on n'a pu ainsi retrouver qu'une partie (50 % environ) du chlore organique correspondant au chloralose ingéré.

Supposant gratuitement d'ailleurs, qu'une partie de ce chlore pouvait échapper à l'absorption et s'éliminer par le tube digestif, j'ai, dans un cas (Exp. XI), administré le chloralose par la voie intraperitonéale et, dans ce cas, j'ai pu retrouver la presque totalité du chlore organique correspondant au chloralose introduit.

Dans aucun cas, il n'y a eu passage de glucose dans l'urine ; la réduction de la liqueur de Fehling, quand elle était positive, s'est toujours manifestée tardivement.

Par contre, le chloralose peut toujours être isolé par épuisement direct de l'urine par l'éther acétique. Dans ce cas le chloralose a été purifié par cristallisation dans l'eau après décoloration au noir, puis caractérisé soit par son point de fusion et celui de son benzoylé, soit par son action physiologique (0,002 sur souris de 20 gr.) produisant des effets tout à fait caractéristiques.

§ 3. — Protocole des expériences.

EXPÉRIENCE I

Chien mâle 6 k. 500. Administration du chloralose par sonde œsophagienne.

DATE de l'ingestion	QUANTITÉS ingérées	VOLUME DES URINES	DÉVIATION au tube de 2 dm.
9 mai 1913	1 gr.,50	9-10 mai 70 cc	— 10'
10 mai 1913	1 gr.,50	10-11 mai	—
—	—	11-12 mai 510 cc	—
—	—	12-13 mai 550 cc	—
—	—	13-14 mai 60 cc	—
14 mai 1913	—	14-15 mai 150 cc	— 16'
15 mai 1913	2 gr.	15-16 mai 250 cc	—

EXPÉRIENCE II

Chien mâle 11 k. 500. Administration du chloralose par sonde œsophagienne.

DATE DE L'INGESTION	QUANTITÉS ingérées	VOLUME DES URINES
19 juin 1913	3 gr.	19-20 juin 15 cc
20 juin 1913	3 gr.	20-21 juin 400 cc
21 juin 1913	3 gr.	21-23 juin 400 cc
—	—	23-24 juin 1500 cc
24 juin 1913	3 gr.	24-25 juin 1000 cc
25 juin 1913	4 gr.	25-26 juin 840 cc

EXPÉRIENCE III

Chien mâle 11 k. Administration du chloralose par sonde œsophagienne.

DATE de l'ingestion	QUANTITÉS ingérées	VOLUME DES URINES	DEVIATION au tube de 2 dm.
22 décembre 1913	3 gr.	22-23 déc. 250 cc	
23 décembre 1913	3 gr.	23-24 déc. 640 cc	
24 décembre 1913	3 gr.,5	24-26 déc. 850 cc	
26 décembre 1913	3 gr.	26-27 déc. 430 cc	
27 décembre 1913	3 gr.,5	27-28 déc. 930 cc	— 20'
29 décembre 1913	3 gr.	29-30 déc. 485 cc	— 10'

EXPÉRIENCE IV.

Chien mâle fox-terrier jeune 13 k. — Administration par la sonde œsophagienne.

DATE de l'ingestion	QUANTITÉS ingérées	VOLUMES DES URINES	DÉVIATION au tube de 2 dm.	CL. ORGANIQUE par litre en chloralose
8 janvier 1914	3 gr.	8-9 janv. 140 ^{cc}	— 12'	0 gr. 89
9 janvier 1914	3 gr.	9-10 — 70 ^{cc}	— 48'	1 gr. 70

L'animal a été trouvé mort le 10 janvier.

EXPÉRIENCE V

Chien mâle boule-dogue 10 k. Administration du chloralose par la sonde œsophagienne.

DATE DE L'INGESTION	QUANTITÉS ingérées	VOLUMES DES URINES
16 janvier 1914	3 gr.	16-17 janvier 60 cc
17 janvier 1914	2 gr.	17-18 janvier 500 cc
18 janvier 1914	—	18-19 janvier 235 cc
19 janvier 1914	3 gr.	19-20 janvier 305 cc
20 janvier 1914	2 gr.	20-21 janvier —
21 janvier 1914	—	21-22 janvier 75 cc
22 janvier 1914	—	22-23 janvier 230 cc

L'expérience a été interrompu, car l'animal refusait toute nourriture,

EXPÉRIENCE VI.

Chien genre Danois (taille basse) 12 k.—Administration par la sonde œsophagienne.

DATE de l'ingestion	QUANTITÉS ingérées	VOLUMES DES URINES	DÉVIATION au tube de 2 dm.
6 février 1914	3 gr.	6-7 fév. 250 cc	— 7' 30"
7 février 1914	3 —	7-8 fév. 980 cc	— 10'
8 février 1914		8-9 fév. —	
9 février 1914	3 —	9-10 fév. 560 cc	— 2'
10 février 1914 Mort le 11.	3 —	10-11 fév. 270 cc	— 2'

EXPÉRIENCE VII

Chien mâle 13 k., poil ras. Administration par sonde œsophagienne

DATE de l'ingestion	QUANTITÉS ingérées	VOLUMES DES URINES	DÉVIATION au tube de 2 dm.	CL. ORGANIQUE par litre en chloralose
13 février 1914	3 gr.	13-14 fév. 800 cc	— 2'	1 gr. 19'
14 février 1914	2 gr.	14-15 fév. —		
15 février 1914	—	15-16 fév. 175 cc	— 3'	
16 février 1914	—	16-17 fév. 500 cc		
17 février 1914	—	17-18 fév. —		
18 février 1914	—	18-19 fév. —		
19 février 1914	—	19-20 fév. 275 cc		
20 février 1914	—	20-21 fév. —		
21 février 1914	—	21-22 fév. 60 cc ⁽¹⁾		

(1) Le chien a été sondé. Il refuse toute nourriture, l'expérience a été interrompue.

EXPÉRIENCE VIII

Chien mâle 9 k. Administration du chloralose par la sonde œsophagienne.

DATE DE L'INGESTION	QUANTITÉS ingérées	VOLUMES DES URINES
21 février 1914	2 gr.,5	21-22 fév. 250 cc
22 février 1914	—	22-23 fév. 200 cc
23 février 1914	2 gr.,5	23-24 fév. —

L'animal a été trouvé mort le 24 février.

EXPÉRIENCE IX.

Observations

Dans les divers examens polarimétriques qui ont été faits, la déviation a été le plus souvent nulle ou légèrement dextrogyre.

Extraction du Chloralose libre. — Les liquides bien mélangés provenant des traitements au sous-acétate de plomb, étaient examinés au polarimètre. Ils ne produisaient aucune déviation. Ils cédaient abondamment du chloralose à l'éther acétique.

L'absence de déviation pouvait donc provenir de la forte quantité de chloralose en solution qui, déviant à droite, aurait annulé la déviation lévogyre du conjugué glycuronique ; on a donc épuisé 5 fois 200 cc. de liquide par de l'éther acétique (40 cc. chaque fois) pour enlever la plus grande partie du chloralose. Après ces traitements, il n'y avait encore aucune déviation observable. Le glycuronique était donc en trop faible quantité dans les liquides pour pouvoir produire une déviation lévogyre.

EXPÉRIENCE IX.

Chien mâle. Administration par la sonde œsophagienne.

DATE de l'ingestion	QUANTITÉS ingérées	VOLUMES DES URINES	CL. ORGANIQUE en chloralose par litre
26 février 1914	3 gr.	26-27 février. 475	mélange 3 gr., 31
27 — —		27-28 — 525	
28 — —	3 —	28-1 mars... 390	
1 ^{er} mars —		1-2 — 875	0 gr., 78
2 — —	3 —	2-3 — 550	
3 — —		3-4 — 605	
4 — —	3 —	4-5 — 680	mélange 1 gr., 42
5 — —		5-6 — 330	mélange 1 gr., 45
6 — —	3 —	6-7 — 550	
7 — —		7-8 —	
8 — —		8-9 — } 1330	1 gr., 24
9 — —	3 —	9-10 — 465	0 gr., 62
10 — —		10-11 — 525	0 gr., 366
11 — —	2 gr., 5	11-12 — 500	0 gr., 64
12 — —		12-13 — 180	mélange 0 gr., 49
13 — —		13-14 — 800	
14 — —	3 gr.	14-15 — 250	
15 — —		15-16 — 310	mélange 0 gr., 52
16 — —		16-17 — 200	0 gr., 16
17 — —		17-18 — 410	0 gr., 25
18 — —		18-20 —	0 gr., 31
20 — —		20-22 —	0 gr., 43
22 — —		22-23 —	0 gr., 10
	23 gr., 5		12 gr., 086

On y a dosé d'une façon assez approximative le chloralose libre. 200 cc. ont été épuisés 15 fois par l'éther acétique (40 cc. chaque fois). On a séché l'éther acétique sur le sulfate de soude anhydre, puis on a évaporé à sec. Tous ces traitements étant faits aussi quantitativement que possible, on a pesé 0 gr.,3455 de chloralose brut fondant, à 168°. Dans la totalité des liquides (5 litres 700) ; il y en avait donc :

$$\frac{0 \text{ gr.},3455 \times 5700}{200} = 9 \text{ gr.},84.$$

Le chloralose pur a été calculé en y dosant le chlore organique. On en a trouvé 7 gr.,78.

Le reste du chloralose impur a été purifié par traitement au noir animal de sa solution dans l'alcool faible qui a été ensuite évaporé à sec. Le point de fusion s'est élevé alors de 8 degrés : 176-177°.

Une nouvelle purification l'a amené à 178-179°. (Point de fusion du chloralose employé dans cette expérience, 180-181°.

Le reste du liquide plombique traité par l'ammoniaque a fourni un précipité pesant 17 gr., ne contenant que fort peu de conjugué glycuronique que l'on a caractérisé par les méthodes décrites aux Chapitres III et IV.

EXPÉRIENCE X

Chien précédent. Administration par voie intrapéritonéale.

DATE de l'injection	QUANTITÉS injectées	VOLUME des urines	CL. ORGANIQUE en chloralose par litre
24 avril 1914		24-25 avril 450 cc ⁽¹⁾	0 gr.,000
25 avril 1914	1 gr.	25-26 —	0 gr.,750
26 avril 1914		26-27 — } 1450 cc	
27 avril 1914	1 gr.	27-28 avril 880 cc	mélange. 0 gr.,846
28 avril 1914		28-29 avril 785 cc	
29 avril 1914	1 gr.	29-30 avril 1470 cc	mélange. 0 gr.,741
30 avril 1914		30-1 ^{er} mai 850 cc	
1 ^{er} mai 1914		1 ^{er} -2 mai 570 cc ⁽¹⁾	
	3 gr.		TOTAL.. 2 gr.,337

(1) Un accident a empêché l'analyse de ces portions. Les jours suivants les urines ne contenaient presque plus de chlore organique.

Sur les urines du 27 au 29 (volume 1665 cc.) on a fait la recherche du glycuronique. Après défécation à la baryte et concentration à 100 cc. on a traité par un volume 1/2 d'acétate neutre de plomb. Le liquide ainsi obtenu (250 cc.) a été filtré et examiné au polarimètre (tube de 20 cm.) on a trouvé une déviation de — 4 minutes. On peut en conclure que l'élimination glycuronique a été faible.

EXPÉRIENCE XI

Chien mâle. Administration par la sonde œsophagienne.

DATE DE L'INGESTION	QUANTITÉS ingérées	VOLUMES DES URINES
25 avril 1914	3 gr.	25-26 avril
26 avril 1914		26-27 avril
27 avril 1914	3 gr.	27-28 avril 615 cc
28 avril 1914		28-29 avril 1300 cc
29 avril 1914	0 gr.,50	29-30 avril 857 cc
30 avril 1914		30-1 ^{er} mai 1625 cc
1 ^{er} mai 1914	2 gr.,50	1 ^{er} -2 mai 475 cc

EXPÉRIENCE XII.

Chien mâle noir et blanc 11 k. Administration par la sonde œsophagienne.

DATE de l'ingestion	QUANTITÉS ingérées	VOLUMES DES URINES	DÉVIATION au tube de 2 dm.
19 mai 1913..	3 gr.	19-20 mai 550 cc	— 3'
20 mai 1913..		20-21 mai 650 cc	— 4'
21 mai 1913..	3 gr.	21-22 mai 250 cc	— 15'
22 mai 1913..		22-23 mai 375 cc	— 3'
23 mai 1913..	3 gr.	23-24 mai 60 cc	— 20'
24 mai 1913..		24-25 mai 420 cc	— 3'
25 mai 1913..		25-26 mai 400 cc	— 2'

EXPÉRIENCE XIII

Chien ratier jaune 10 k. Administration par voie œsophagienne.

DATE de l'ingestion	QUANTITÉS ingérées	VOLUMES DES URINES	Déviation au tube de 2 dm après précipi- tation par l'acétate neutre de plomb.	Déviation après précipi- tation par l'acétate basique de plomb, puis par Am OH.
25 mai 1914	3 gr.	25-26 mai 280 cc	— 20'	—
26 mai 1914	—	26-27 mai 360 cc	— 3'	+4
27 mai 1914	3 gr.	27-28 mai 425 cc	— 12'	0
28 mai 1914	1 gr., 50	28-29 mai 320 cc	— 17'	0
29 mai 1914	2 gr.	29-30 mai 485 cc	— 12'	— 2'
30 mai 1914	—	30-31 mai 535 cc	— 10'	0
31 mai 1914	—	31-1 ^{er} juin 385 cc	— 8'	— 2'
1 ^{er} juin 1914		1-2 juin 355 cc	— 5'	0
2 juin 1914	3 gr.	2-4 juin 500 cc	— 6'	0
4 juin 1914	2 gr.	4-5 juin 500 cc	— 5'	— 2'
5 juin 1914	2 gr.	5-6 juin 260 cc	— 24'	— 2'
6 juin 1914	—	6-7 juin		
7 juin 1914	—	7-8 juin		

§ 4.— Dosage du chlore organique.

Dans les expériences IX et X je me suis attaché à suivre l'élimination urinaire du chlore organique; celui-ci a été déterminé par différence entre le chlore total et le chlore minéral.

Le **chlore total** se dose aisément par le procédé suivant :

Dans un creuset de platine de 45 millimètres de haut, on évapore au bain-marie 5 cent. cubes d'urine, en présence de 2 gr. de carbonate de potasse anhydre et de 2 gr. de nitrate de soude, en remuant avec un petit agitateur jusqu'à ce qu'on ait une masse granulée bien sèche.

On ajoute alors 6 gr. de nitrate de soude et on chauffe au bec Bunsen. La masse fond, se boursoufle, la matière organique est détruite avec formation de nitrite de soude et de chlorures alcalins. Quand elle est bien blanche, on cesse de chauffer.

Le contenu du creuset est dissous dans de l'eau distillée chaude et versé dans une capsule de porcelaine de 15 cent. de diamètre. On la couvre avec un entonnoir renversé et on verse 15 cent. cubes d'acide nitrique au demi.

Il se produit une forte effervescence, mais l'entonnoir arrête les projections. On ajoute ensuite 20 cc. de nitrate d'argent $\frac{N}{10}$ exactement mesurés. On porte au bain-marie bouillant la capsule recouverte avec l'entonnoir et on chauffe jusqu'à disparition des vapeurs nitreuses.

Après refroidissement, on y titre, par la méthode Charpentier-Volhardt, au sulfocyanure d'ammonium, l'argent en excès; on déduit ensuite le chlore.

Le **chlore minéral** est dosé également par cette méthode. Pour n'avoir pas à tenir compte de la faible quantité de chlore apportée par les sels alcalins même purs, on dissout dans la capsule 8 gr. de nitrate de soude et 2 gr. de carbonate de potasse dans 100 cent. cubes d'eau. On couvre avec un entonnoir renversé et on verse 15 cent. cubes d'acide nitrique au $\frac{1}{2}$, puis enfin 5 cent. cubes d'urine.

Pour contrôler les résultats obtenus on a fait un dosage de chlore total par la méthode à la chaux, telle qu'elle est décrite dans tous les traités de chimie organique.

5 cent. cubes d'urine, évaporés à consistance sirupeuse, ont été mélangés avec 1 gr. de chaux vive pure.

La poudre ainsi obtenue a servi pour le dosage.

Chlore total dans une même urine :

1 ^o Par la chaux.....	5 gr.,29	par litre
2 ^o Par fusion au nitre.....	5 gr.,32	—

Les 2 méthodes donnent donc des résultats absolument concordants.

La méthode par fusion au nitre a été désormais seule employée, parce qu'elle est plus simple.

Conclusions. — Mes résultats ne sont pas encore assez nombreux pour tirer des conclusions fermes. L'expérience IX montre que par voie œsophagienne une partie seulement du chlore organique du chloralose se retrouve dans l'urine, alors que, dans l'expérience X, par administration intrapéritonéale, on retrouve sensiblement la totalité du chlore organique introduit. Mais, dans l'expérience IX, l'isolement du chloralose a été effectué et on a pu retrouver ainsi 65 % du chlore organique.

Il est très vraisemblable que, dans l'expérience X, faite sur le même animal, le chlore organique urinaire soit constitué presque exclusivement par du chloralose ; il en résulterait alors, que tout le chloralose introduit aurait été éliminé en nature. Ces recherches seront reprises ultérieurement en vue d'apporter une solution à la question d'ordre pharmacodynamique que je me suis posée dans l'introduction.

CHAPITRE III.

Traitement de l'urine des animaux chloralosés.

Recherche et isolement des conjugués glycuroniques.

Cette étude comporte deux parties, à savoir : tout d'abord la recherche, c'est-à-dire la mise en évidence de l'existence d'un conjugué glycuronique ; puis l'isolement de ce conjugué sous forme de sel ou de solutions assez pures et assez concentrées pour que, dans ce dernier cas, l'isolement, *en nature*, du corps combiné à l'acide glycuronique soit possible.

J'examinerai successivement ces deux points et, pour chacun d'eux, les méthodes connues et l'application que j'en ai faite au cas des urines de chiens chloralosés.

§ 1. — Caractérisation d'un dérivé glycuronique.

Caractères généraux des conjugués glycuroniques.

Pouvoir rotatoire et action réductrice. — Tous les conjugués glycuroniques actuellement connus dévient à gauche la lumière polarisée et réduisent lentement, à l'ébullition, le réactif eupropotassique. Lorsqu'on les chauffe avec des

EXPÉRIENCE VI.

Chien genre Danois (taille basse) 12 k.—Administration par la sonde œsophagienne.

DATE de l'ingestion	QUANTITÉS ingérées	VOLUMES DES URINES	DÉVIATION au tube de 2 dm.
6 février 1914	3 gr.	6-7 fév. 250 cc	— 7' 30"
7 février 1914	3 —	7-8 fév. 980 cc	— 10'
8 février 1914		8-9 fév. —	
9 février 1914	3 —	9-10 fév. 560 cc	— 2'
10 février 1914 Mort le 11.	3 —	10-11 fév. 270 cc	— 2'

EXPÉRIENCE VII

Chien mâle 13 k., poil ras. Administration par sonde œsophagienne

DATE de l'ingestion	QUANTITÉS ingérées	VOLUMES DES URINES	DÉVIATION au tube de 2 dm.	CL. ORGANIQUE par litre en chloralose
13 février 1914	3 gr.	13-14 fév. 800 cc	— 2'	1 gr. 19'
14 février 1914	2 gr.	14-15 fév. —		
15 février 1914	—	15-16 fév. 175 cc	— 3'	
16 février 1914	—	16-17 fév. 500 cc		
17 février 1914	—	17-18 fév. —		
18 février 1914	—	18-19 fév. —		
19 février 1914	—	19-20 fév. 275 cc		
20 février 1914	—	20-21 fév. —		
21 février 1914	—	21-22 fév. 60 cc		

(1) Le chien a été sondé. Il refuse toute nourriture, l'expérience a été interrompue.

EXPÉRIENCE VIII

Chien mâle 9 k. Administration du chloralose par la sonde œsophagienne.

DATE DE L'INGESTION	QUANTITÉS ingérées	VOLUMES DES URINES
21 février 1914	2 gr.,5	21-22 fév. 250 cc
22 février 1914	—	22-23 fév. 200 cc
23 février 1914	2 gr.,5	23-24 fév. —

L'animal a été trouvé mort le 24 février.

EXPÉRIENCE IX.

Observations

Dans les divers examens polarimétriques qui ont été faits, la déviation a été le plus souvent nulle ou légèrement dextrogyre.

Extraction du Chloralose libre. — Les liquides bien mélangés provenant des traitements au sous-acétate de plomb, étaient examinés au polarimètre. Ils ne produisaient aucune déviation. Ils cédaient abondamment du chloralose à l'éther acétique.

L'absence de déviation pouvait donc provenir de la forte quantité de chloralose en solution qui, déviant à droite, aurait annulé le déviation lévogyre du conjugué glycuronique ; on a donc épuisé 5 fois 200 cc. de liquide par de l'éther acétique (40 cc. chaque fois) pour enlever la plus grande partie du chloralose. Après ces traitements, il n'y avait encore aucune déviation observable. Le glycuronique était donc en trop faible quantité dans les liquides pour pouvoir produire une déviation lévogyre.

qu'une précipitation incomplète, déjà signalée par plusieurs observateurs. L'addition d'ammoniaque, après le sous-acétate de plomb, amène une précipitation à peu près totale.

Paul MAYER, par exemple, dans une étude de l'urine des chiens chloralosés, a signalé toutes ces particularités ; il les attribue, il est vrai, à des conjugués glycuroniques différents.

Examen des urines des animaux chloralosés.

De telles urines réduisent la liqueur cupropotassique après une longue ébullition en donnant parfois, ainsi que l'indiquent GUIART et GRIMBERT (1) pour les urines à acide glycuronique, des teintes verdâtres, comme lorsqu'il s'agit d'une urine faiblement sucrée et riche en créatine.

Pour y déceler la présence d'un conjugué glycuronique, on ne peut songer à les hydrolyser directement ou après concentration, parce qu'elles renferment, comme je le montrerai plus loin, du chloralose libre qui, en s'hydrolysant, donne du chloral et du glucose déviant à droite, et qui produit, par chauffage avec la phloroglucine et l'orcine en solution chlorhydrique, des liquides colorés.

De plus, le glucose se combinerait aussi avec la phénylhydrazine et ses composés pour donner des osazones qu'il faudrait isoler de celles formées avec l'acide glycuronique.

Pour constater rapidement la présence de conjugué glycuronique dans les urines que j'ai étudiées, j'ai utilisé l'action du réactif cupropotassique et les variations du du pouvoir rotatoire avant et après traitement par le sous-acétate de plomb.

(1) GUIART ET GRIMBERT. — Diagnostic chimique, microscopique, parasitologique, 3^e édition, page 931.

50 cm³ d'urine étaient délégués par quelques centimètres cubes de solution d'acétate neutre de plomb à 20 % et examinés au polarimètre. L'addition d'un excès de sous-acétate ne devait qu'affaiblir la déviation sans la faire disparaître ; si on ajoutait ensuite 1 ou 2 centimètres cubes d'ammoniaque au liquide plombique, on devait constater une déviation nulle ou tout au plus de — 2 minutes.

Pour une étude approfondie, j'ai éliminé le chloralose, afin de pouvoir appliquer, en toute sécurité, quelques-unes des réactions précédentes.

J'ai essayé, d'abord, d'épuiser les urines par l'éther acétique qui dissout assez bien le chloralose ; mais j'ai dû bientôt abandonner ce procédé qui est très long, très coûteux et insuffisant.

Pour enlever 0,25 centig. de chloralose en solution dans 100 cm³ d'eau, j'ai fait 5 épuisements et j'ai employé 200 cm³ d'éther acétique.

La même opération, faite sur une solution aqueuse d'urée et de chloralose, a montré que l'urée était aussi dissoute par l'éther acétique,

Des essais analogues effectués sur plusieurs urines ont fait voir qu'après une dizaine d'épuisements on pouvait encore, dans l'urine parfaitement neutralisée, puis concentrée dans le vide, extraire de nouveau du chloralose.

Enfin, il est fort probable que l'éther acétique, employé en aussi grande quantité, entraîne du conjugué glycuronique mis en liberté par l'acide que contient toujours l'éther.

J'ai donc traité les urines par le sous-acétate de plomb et l'ammoniaque ; j'ai eu ainsi un précipité que l'on peut purifier par des lavages soignés et où il ne reste plus de traces de chloralose.

Ce précipité, traité par les acides minéraux étendus, donnent des solutions du conjugué glycuronique que l'on peut étudier ; elles dévient à gauche, réduisent lentement le réactif cupro-potassique. Hydrolysées, elles le réduisent rapidement et dévient à droite.

J'ai pu, par des traitements que j'indiquerai en détail dans d'autres chapitres, isoler en *nature* le corps combiné à l'acide glycuronique et, d'autre part, caractériser ce dernier par tout un ensemble de réactions : précipitation par le sous-acétate de plomb, réduction intense et rapide du réactif cupropotassique ; colorations avec la phloroglucine, l'orcine, le réactif de Tollens, et enfin par son action dextrogyre sur la lumière polarisée.

§ 2. — Isolement du dérivé glycuronique.

L'isolement des conjugués glycuroniques contenus dans l'urine est basée, d'une part, sur leur solubilité dans un mélange d'éther et d'alcool et, d'autre part, sur leurs propriétés de précipiter par le sous-acétate de plomb ; mais ni l'un ni l'autre de ces moyens de séparation n'est applicable dans tous les cas (1).

On peut dire, de ces deux méthodes d'isolement, qu'elles reposent toutes deux sur la précipitation des conjugués glycuroniques par le sous-acétate de plomb, ou, ce qui serait préférable, par le sous-acétate de plomb ammoniacal. Ce qui les différencie, c'est le traitement que l'on fait subir à l'urine avant de faire agir le réactif précipitant.

Dans la première méthode, on peut (comme l'ont fait, par exemple, KÜLZ pour l'extraction de l'acide urochlo-ralique, NEUBERG et LACHMAN pour l'acide mentholglycuronique, IMPENS pour le conjugué glycuronique dérivé de l'acide trichlorisopropylique, etc., etc...), épuiser l'urine amenée à un plus ou moins grand état de concentration par un mélange d'éther et d'alcool. Celiquide, séparé de l'urine, est neutralisé, puis évaporé à consistance d'extrait et traité

(1) *Hoppe Seyler's Handbuch der Physio. und Pathologische chemischen Analyse*, 3^e édition, p. 343.

par le sous-acétate de plomb. Parfois on le purifie en le traitant d'abord par l'acétate neutre.

Dans la seconde méthode, employée par P. MAYER (1), IMPENS (2) et autres, on fait subir à l'urine deux purifications successives en la traitant par l'eau de baryte et le chlorure de baryum et, ensuite, par l'acétate neutre de plomb. C'est dans ce liquide, déjà peu coloré, que l'on verse le sous-acétate de plomb.

IMPENS, dans ses recherches « sur le sort de l'alcool trichlorisopropylique dans l'organisme », a obtenu d'excellents résultats en employant ainsi le sous-acétate de plomb comme unique précipitant du glycuronique.

MAYER a également traité ainsi l'urine des chiens chloralosés, mais comme la précipitation n'était pas complète avec le sous-acétate, puisque l'urine restait lévogyre, il a été conduit à admettre l'existence de plusieurs composés lévogyres, l'addition d'ammoniaque abaissant notablement le pouvoir rotatoire, sans le faire disparaître complètement. MAYER en concluait qu'il y avait un second conjugué glycuronique que ne précipitait pas le sous-acétate de plomb.

C'est pour pouvoir comparer les résultats de mon étude de l'urine des chiens chloralosés avec ceux obtenus par MAYER que j'ai adopté sa méthode, au moins dans ses grandes lignes.

Quant à l'emploi du mélange éther alcool, il conduit à un précipité par le sous-acétate, beaucoup plus pur que celui obtenu par la seconde méthode. Il ne contiendra, en effet, qu'une faible partie du chlore minéral de l'urine; mais la dissolution du glycuronique n'est pas complète en un seul traitement. Il faut en faire 3 ou 4 et même quelquefois plus, pour voir disparaître ou s'atténuer fortement le pouvoir lévogyre de l'urine.

(1) P. MAYER.— *Zeits. f. Kl. Med.* (1902), 47, 79.

(2) IMPENS.— *Arch. int. Pharm. et Th.* (1901), 13, 39-43.

En résumé, cette méthode d'extraction par l'alcool-éther est plus compliquée, plus pénible et plus couteuse que la seconde ; elle ne paraît pas, au moins dans la majorité des cas, devoir lui être préférée.

Une fois obtenus par l'une ou l'autre méthode, les précipités plombiques contenant les conjugués glycuroniques sont soigneusement lavés, puis ils sont traités en vue de la mise en liberté de ces conjugués.

Les procédés employés dans ce but sont assez nombreux. Il en est un qui a servi à beaucoup de chimistes et qui est pour ainsi dire classique. Il consiste à mettre le précipité en suspension dans l'eau et à le décomposer par un courant d'hydrogène sulfuré. Tous les acides minéraux ou organiques qu'il contient sont remis en liberté et rentrent en solution avec le glycuronique. La substitution du sulfure de baryum (Kotake(1) à l'hydrogène sulfuré présente l'avantage de neutraliser l'acidité du liquide au fur et à mesure de la libération des acides ; mais les sels de baryum formés restent en solution.

On peut décomposer aussi les précipités plombiques par l'acide sulfurique à 10 % ; ce procédé, employé par HÄMÄ-LÄINEN, ne donne pas de solutions absolument exemptes de plomb ; il remet en liberté tout l'acide chlorhydrique combiné au plomb, de sorte que, si l'on n'a pas employé un excès d'acide sulfurique, l'acidité minérale du liquide sera due uniquement à l'acide chlorhydrique.

Quand le conjugué glycuronique peut donner un sel de zinc peu soluble, on a avantage, aussitôt après l'action de l'hydrogène sulfuré, à neutraliser la solution par un excès d'oxyde de zinc et à la concentrer après filtration à chaud. Un traitement, souvent fort simple, permet d'obtenir le sel de zinc du conjugué glycuronique dans un état de pureté suffisant (IMPENS) (2).

(1) Y. KOTAKE.— *Z. f. ph. Ch.*, 45, 320.

(2) IMPENS.— *Archives internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, XIII, page 42.

Je vais décrire, avec détails, la méthode que j'ai appliqué aux urines de chiens chloralosés, en insistant sur les modifications que j'ai apportées au traitement des sels de plomb. J'exposerai successivement :

(A) les traitements à faire subir à l'urine pour obtenir les combinaisons plombiques,

(B) la préparation, au moyen de celles-ci, des solutions du conjugué glycuronique.

A. — Traitement à faire subir à l'urine pour obtenir les combinaisons plombiques de conjugués glycuroniques.

a) *Traitement barytique.* — Les urines des chiens, en expérience, s'altéraient rapidement et contenaient beaucoup de carbonate d'ammoniaque. On y ajoutait, jusqu'à cessation de précipité, de l'eau de baryte contenant 1 % de chlorure de baryum. Il est avantageux, pour éviter une trop grande dilution, de se servir d'eau de baryte tiède, saturée à la température de 30-40°. Après une heure ou deux de repos, on débarrassait le liquide du précipité volumineux, en le filtrant sur un grand Buchner. L'excès de baryte était éliminé dans le liquide limpide par l'acide sulfurique au 1/4, ajouté jusqu'à acidité. On neutralisait ensuite au moyen de quelques pincées de carbonate de chaux ou de baryte et on essorait.

Buchner.

Il était intéressant de savoir si le précipité barytique n'entraînait pas le conjugué glycuronique ou d'autres corps renfermant du chlore organique.

Voici comment cette question a été résolue :

3 litres 700 d'urine, contenant 5 gr., 75 de chlore minéral et 0 gr., 57 de chlore organique par litre, ont été précipité par 1 litre 400 d'eau de baryte. On a recueilli 4 litres 800 de liquide correspondant à 3 litres 540 d'urine.

L'élimination de l'excès de baryte a exigé 100 cm³ d'acide sulfurique au 1/4. Après neutralisation et filtration, on y a dosé le chlore organique. On en a trouvé 0,42 par litre. Pour les essais ultérieurs, on a prélevé 4 litres 800 de solution correspondant à 3 litres 412 d'urine et, d'après le premier dosage effectué sur l'urine avant tout traitement il y avait $0 \text{ gr. } 57 \times 3,412 = 1 \text{ gr. }, 94$ de chlore organique; or, on en a retrouvé $0,42 \times 4 \text{ gr. }, 8 = 2 \text{ gr. }, 01$.

Le précipité barytique ne contient donc pas de corps renfermant du chlore organique.

J'ai préféré doser le chlore organique dans le liquide, plutôt que dans le précipité, car celui-ci s'essore mal et est difficile à laver. J'ai commis une légère erreur dans le calcul des volumes, à cause des précipités formés par les réactifs.

b) *Traitement à l'acétate neutre.* — Le liquide provenant du traitement précédent était concentré dans le vide, puis, après refroidissement, filtré sur Buchner.

Quand la réaction au tournesol était neutre ou alcaline, on ajoutait quelques gouttes d'acide acétique pour obtenir une *très légère acidité* ; alors, seulement, on ajoutait l'acétate neutre de plomb en solution à 20 % jusqu'à cessation de précipité. Il est indispensable de n'opérer la précipitation qu'en milieu faiblement acide et non en milieu alcalin, afin d'éviter la formation d'une trace de sous-acétate de plomb qui précipiterait un peu du conjugué glycuronique. Le mélange, conservé pendant 12 heures en flacon bouché, était filtré sur Buchner.

Même concentrées, les urines ne fournissaient pas toutes un précipité quand on y versait seulement quelques gouttes de sous-acétate de plomb. J'en ai rencontré deux qui ne commençaient à troubler que quand on y avait versé environ la moitié de leur volume de réactif. Elles étaient

beaucoup plus riches que les autres en conjugué glycu-
rique.

Dans un cas, 4 litres 800 de liquide, ramenés par concen-
tration dans le vide à 570 cm³, ont exigé 450 cm³ de solution
d'acétate neutre. Ils ont fourni un précipité qui, lavé so-
igneusement à l'eau distillée et séché dans le vide, pesait
50 grammes.

On y a dosé le chlore minéral et le chlore total. 20 gram-
mes de ce précipité, pulvérisés, mis en suspension dans
l'eau distillée, furent décomposés par un courant d'hydro-
gène sulfuré. Pendant cette opération, on ajoutait des
petites pincées de carbonate de chaux pour éviter une aci-
dité trop forte due à libération des acides des sels de
plomb par l'hydrogène sulfuré. Pour que la décomposition
du précipité soit complète, on laissait reposer 12 heures ;
on neutralisait ensuite exactement avec du carbonate de
chaux.

Le liquide, avec le précipité, fut amené au volume de 250
cm³, puis filtré au Buchner. On obtint 190 cm³ de liquide lim-
pide. L'hydrogène sulfuré ayant été chassé par une longue
ébullition, le liquide refroidi fut ramené au volume de
190 cm³. Le chlore minéral et le chlore total purent alors y
être dosés par la méthode ordinaire. Sachant que 1 cm³ de
la solution = $\frac{20}{250} = 0,04$ de précipité, on a calculé que les
50 grammes de précipité renfermaient 0,533 de chlore
total et 0,577 de chlore minéral. Donc, pas de chlore orga-
nique.

Il ne faut pas s'étonner de trouver le chlore total légè-
rement inférieur au chlore minéral. Une différence de 0,1,
qui est de l'ordre des erreurs d'expérience, entre les volu-
mes du nitrate d'argent $\frac{N}{10}$ employés dans les deux dosa-
ges, pour précipiter 5 cm³ de liquide, suffit pour produire
un écart de 0,04 entre les deux résultats.

Une autre cause intervient encore pour augmenter le

chlore minéral. Malgré une très longue ébullition, le liquide garde presque toujours une trace d'hydrogène sulfuré qui, dans le milieu faiblement nitrique où se fait le dosage du chlore minéral, se combine avec le nitrate d'argent en communiquant une légère teinte brune à la liqueur. Le soufre, combiné à l'argent, est compté comme chlore. Dans le dosage du chlore total, qui est précédé d'une fusion au nitre, le soufre est oxydé et n'entre plus dans la réaction de précipitation.

Ces dosages montrent que les corps contenant du chlore organique ne sont pas précipités par l'acétate neutre de plomb et que le chlore minéral ne l'est que très incomplètement : 0,577 seulement sur 23 grammes environ que contenaient les 4 litres 800 de liquide ; le chlorure de plomb est maintenu en solution par la forte proportion de matière organique et de sels ammoniacaux qui se trouvent dans le liquide concentré.

Ce chlore se retrouvera en presque totalité dans le précipité obtenu dans l'opération suivante, comme je l'ai constaté en dosant le chlore minéral dans un précipité fourni par une autre urine.

c) *Traitement par le sous-acétate de plomb.* — La précipitation par le sous-acétate de plomb se fait exactement comme celle à l'acétate neutre.

Le précipité, bien lavé et essoré, est mis à digérer au bain-marie avec beaucoup d'eau distillée, puis essoré de nouveau. L'opération est répétée plusieurs fois. Il est ensuite séché dans le vide sulfurique.

Dans un cas, la solution provenant du traitement à l'acétate neutre produisait une déviation polarimétrique de — 32 minutes. Additionnée de 570 cm³ de sous-acétate de plomb (solution du Codex), elle ne donnait plus de précipité après 12 heures de repos. Après séparation du précipité au Buchner, le volume était de 1500 cm³ et sa dévia-

tion polarimétrique de — 14 minutes. Il n'est pas possible de savoir exactement à quel volume de solution traitée à l'acétate neutre les 1500 cm³ correspondent, mais on peut le calculer avec une certaine approximation. On avait ajouté 570 cm³ de sous-acétate ; il y avait donc, *au moins*, 1500 — 570 = 930 cm³ de liquide venant de l'acétate neutre. Ce volume est un peu faible, parce que le précipité produit par le sous-acétate a retenu un peu du liquide ; par suite, le volume, avant essorage, était supérieur à 1500 cm³. En adoptant le volume de 1000, on ne sera pas bien loin de la réalité. On peut alors calculer la déviation polarimétrique D que produirait le liquide traité au sous-acétate, si on le ramenait par concentration au volume de 1000 cm³.

Les déviations étant en raison inverse des volumes, on a

$$\frac{D}{(-14)} = \frac{1500}{1000} \text{ d'où } D = \frac{1500 \times (-14)}{1000} = -21 \text{ minutes.}$$

Il y a donc eu précipitation d'une quantité de corps lévogyre capable de produire, après dissolution dans 1000 cm³ de liquide, une déviation gauche de 32-21 = 11 minutes.

Une autre urine ayant subi les mêmes traitements avait, après séparation du précipité par l'acétate neutre, un volume de 535 cm³ et produisait une déviation gauche de 12 minutes. Après addition de 280 cm³ de sous-acétate, le volume total était alors voisin de 815 cm³ ; la déviation n'était plus que de — 6 minutes. Si on calcule D comme précédemment, on trouve :

$$\frac{D}{(-6)} = \frac{815}{535} \text{ d'où } D = \frac{815 \times (-6)}{535} = -9 \text{ minutes.}$$

Le sous-acétate précipite donc une quantité de corps lévogyre capable de donner une déviation de :

$$12 - 9 = 3 \text{ minutes.}$$

Le liquide séparé du précipité produit par le sous-acétate renferme du chloralose libre que l'on peut extraire en

l'agitant avec de l'éther acétique ; le solvant, séché sur le sulfate de soude anhydre et évaporé au bain-marie, laisse un abondant dépôt de chloralose cristallisé, que l'on caractérise comme je l'indiquerai plus loin après l'avoir purifié par cristallisation dans l'eau.

J'ai fait une série d'épuisements à l'éther acétique sur 2 liquides provenant d'urines différentes, afin d'observer les variations de la déviation polarimétrique au fur et à mesure de la disparition du chloralose qui est faiblement dextrogyre et j'ai fait à cette occasion quelques observations qui méritent d'être signalées.

Un premier échantillon de 100 cm³ a été épuisé 15 fois par l'éther acétique (40 à 50 cm³ chaque fois). Avant le premier épuisement, la déviation était de — 14 minutes. Après le 15^e épuisement, elle n'était plus que de — 2 minutes ou peut être même nulle. Un précipité blanc assez abondant était en suspension dans le liquide. Liquide et précipité furent conservés pendant 3 semaines dans un flacon bouché et agités de temps en temps.

Il fut alors constaté une déviation de — 8 minutes.

Le corps lévogyre n'avait donc pas été dissous par l'éther acétique. Il se trouvait probablement dans le précipité blanc et était rentré ensuite en solution. Je n'ai pas pu trouver la cause de cette précipitation.

Un 2^e échantillon provenant de l'urine d'un chien mort pendant les expériences a été traité de la même façon et avec le même éther acétique. La déviation polarimétrique avant épuisement était de — 10 minutes. Après le 3^e épuisement, elle était de — 8 minutes. Après le 11^e épuisement, elle était encore de — 8 minutes. Il ne s'était formé qu'un très léger précipité blanc. Le chloralose était sans doute en trop petite quantité pour produire une action sensible sur la lumière polarisée, et le corps lévogyre n'était pas dissous d'une façon appréciable au moins dans ce cas par l'éther acétique.

d. — *Traitement par l'ammoniaque.* — J'ai déjà indiqué que le liquide séparé du précipité produit par le sous-acétate de plomb renfermait, selon MEYER, 2 corps lévogyres, dont un seul était précipitable par le sous-acétate de plomb ammoniacal.

A la suite d'un certain nombre d'essais effectués sur des urines provenant de divers chiens, j'ai reconnu qu'il suffisait presque toujours de verser 40 cm^3 d'ammoniaque pur des réactifs par litre de liquide traité par le sous-acétate de plomb, d'agiter vigoureusement pendant quelques minutes, et de laisser reposer 12 heures en flacon bouché, pour que la solution séparée du précipité formé soit inactive ou donne seulement une déviation gauche qui ne dépasse pas 2 minutes.

La totalité du corps ou des corps lévogyres n'est pas précipitée, même quand la déviation est nulle, ce qui arrive assez souvent à cause de la présence du chloralose libre qui se trouve toujours dans la liqueur. Le pouvoir rotatoire dextrogyre de ce corps est faible, mais cependant appréciable. Une solution en renfermant 0,20 pour 50 cm^3 d'eau distillée produit au polarimètre une déviation de $+8$ minutes.

Le précipité ammoniacal est traité comme le précipité du sous-acétate. Les lavages sont un peu plus difficiles ; car il n'est pas pulvérulent et il faut le délayer dans l'eau distillée en se servant d'un mortier de verre. L'essorage en est assez long.

J'ai résumé toutes mes opérations dans le tableau suivant :

Tableau I résumant les opérations précédentes.

L'Urine traitée par de l'eau de baryte renfermant 1 % de chlorure de baryum, fournit un **précipité** qu'on sépare et une solution,
Précipité. — Ne renferme pas de chlore organique.

SOLUTION. Traitement par SO^4H_2 au 1/4. Neutraliser par le carbonate de baryte. Séparer le précipité.	SOLUTION. La concentrer dans le vide. Séparer, s'il y a lieu, le faible précipité formé et la traiter par l'acétate neutre de plomb à 20 0/0. Laisser reposer 12 heures. Séparer le précipité.	SOLUTION. Elle est lévogyre. L'additionner d'un excès de sous-acétate de plomb. Laisser reposer 12 heures. Séparer le précipité.	SOLUTION. Elle est lévogyre et renferme en outre du chloralose. La traiter par l'ammoniaque. Séparer le précipité après un repos de 12 h.	Précipité. Renferme une substance lévogyre. Le laver et le sécher dans le vide.	Précipité. Renferme une substance lévogyre. Le laver et le sécher dans le vide.	SOLUTION. Elle contient du chloralose libre. Elle est inactive ou très faiblement lévogyre.
--	--	---	--	---	---	---

Précipité. — C'est du sulfate de Baryte.

Précipité. — Il ne renferme pas de chlore organique.

Précipité. — Renferme une substance lévogyre. — Le laver et le sécher dans le vide.

B.— Préparation au moyen des combinaisons plombiques des solutions du conjugué glycuronique.

Pour mettre en liberté le conjugué glycuronique, on décompose souvent les précipités plombiques en suspension dans l'eau par l'hydrogène sulfuré. Cette méthode, qui serait relativement facile, si l'on pouvait opérer sur les sels de plomb du composé glycuronique à peu près purs, devient très pénible lorsqu'il faut traiter plusieurs centaines de grammes de précipité complexe, ne contenant que fort peu de conjugué glycuronique.

J'ai, en étudiant en détail le traitement des urines par la méthode de MEYER, reconnu que le précipité produit par le sous-acétate de plomb, fort pauvre en conjugué glycuronique, contient la plus grande partie du chlore minéral existant dans l'urine et introduit par les réactifs.

L'hydrogène sulfuré libère tous les acides organiques et minéraux qui rentrent en solution. Le précipité de sulfure de plomb, gélatineux au début de l'opération, communique au liquide une viscosité qui oblige à diluer fortement pour permettre l'agitation et le passage du courant gazeux sans production d'une mousse trop abondante. Une forte dilution est aussi nécessaire pour diminuer l'acidité et permettre une décomposition rapide et complète des sels de plomb.

Après séparation du sulfure, on se trouve donc en présence de solutions acides volumineuses saturées d'hydrogène sulfuré.

La concentration de telles solutions exige, au moins au début, l'emploi de la chaleur et du vide. Leur forte acidité minérale produit en outre, dans ces conditions, l'hydrolyse d'une partie du glycuronique.

Pour éviter au moins partiellement ces inconvénients,

j'ai utilisé une méthode qui, si elle n'évite pas l'hydrolyse d'une partie du glycuronique, permet au moins de traiter en une seule fois beaucoup de précipité plombique (jusqu'à 500 gr. et plus), sans l'emploi de l'hydrogène sulfuré, tout en donnant des solutions de faible volume pouvant être évaporées à froid dans le vide.

On traite le précipité plombique par l'acide chlorhydrique qui libère seulement les acides organiques, sans agir sur les sels à acides minéraux (chlorure et sulfate).

On reconnaît que l'on a employé assez d'acide chlorhydrique quand une goutte du liquide portée sur un papier au violet de méthyle y produit une coloration vert jaune.

Le papier indicateur se prépare en traçant des lignes sur du papier à filtrer blanc, avec un agitateur trempé dans une solution au 1000^e de violet de méthyl 6 B. Ce papier est employé aussitôt après sa préparation.

L'acide acétique n'y produit aucun changement de coloration. Avec les acides tartrique et oxalique concentrés, la teinte est verte. L'acide chlorhydrique *très étendu* se comporte comme l'acide acétique ; plus concentré, il le décolore au point touché, pendant que les parties périphériques deviennent jaune citron. Avec des solutions chlorhydriques de plus en plus concentrées, on obtient toutes les teintes comprises entre le violet, le jaune vif et la décoloration complète.

Je vais décrire une opération faite avec 480 grammes de sel de plomb.

Le précipité finement pulvérisé est mis dans un vase cylindrique en verre épais plongé dans une terrine contenant de l'eau froide. On verse d'abord 180 cm³ d'eau distillée, on obtient ainsi une pâte fluide, puis, par portions de 4 à 5 cm³ de l'acide chlorhydrique concentré; on agite soigneusement avec un agitateur en verre, et au début on ne fait les additions que très lentement pour éviter un échauffement appréciable. On cesse d'ajouter de l'acide quand une

goutte du liquide qui surnage produit sur le papier au violet de méthyle une coloration vert jaune. On laisse en contact une heure en agitant souvent et on s'assure alors que le liquide produit toujours le même virage. S'il était vert-bleu, on ajouterait un peu d'acide. Au bout d'une heure, on fait un nouvel essai.

On a employé 160 cm³ d'acide chlorhydrique concentré ; le liquide obtenu avait une odeur forte et caractéristique et une coloration brune. Le précipité est essoré au Buchner puis délayé juste avec assez d'eau distillée pour avoir une pâte humide. On essore à nouveau, on fait ainsi 3 épuisements. Le liquide qui passe alors n'est généralement plus coloré.

Tous les liquides sont réunis et mis dans un vase de verre ou de très bonne porcelaine (1), large et peu profond que l'on place sous une grande cloche à vide où se trouvent un cristalliseur contenant de l'acide sulfurique, et un autre contenant de la chaux et de la potasse ou de la soude en plaques (2). On y fait le vide. L'eau s'évaporant d'abord est absorbée par l'acide sulfurique et le mélange de substances alcalines. L'acide chlorhydrique non combiné ne se dégage que vers la fin de l'opération ; il est fixé par la potasse et la chaux. On obtient au bout de deux ou trois jours un extrait sirupeux ayant une odeur piquante d'acide chlorhydrique gazeux, contenant un peu de chlorure de plomb.

On le délaie avec de l'alcool pour renouveler les surfaces et on le remet dans le vide. On arrive ainsi à chasser tout l'acide chlorhydrique ; on se sert d'alcool parce que l'évaporation est ainsi très rapide.

(1) Il ne faut pas se servir d'assiette en faïence, parce que la partie superficielle est attaquée vers la fin de l'opération par HCl concentré qui se trouve alors dans le liquide sirupeux. La silice et l'alumine qui entrent en solution gênent beaucoup dans la suite des opérations.

(2) La potasse ou la soude entrent d'abord en solution. Ils empêchent la chaux en s'éteignant de projeter dans toute la cloche une fine poussière.

Le précipité plombique produit par l'ammoniaque est riche en conjugué glycuronique et pauvre en acides organiques et minéraux ; il pourrait être décomposé par l'hydrogène sulfuré, plus avantageusement que le précipité par le sous-acétate de plomb. On le traite comme celui-ci par HCl. Il contient du carbonate de plomb et mousse avec l'acide. L'échauffement étant assez intense, il faut soigneusement refroidir et n'ajouter l'acide que par très petite quantité.

Dans un traitement fait sur 20 grammes, on a employé 15 cm³ d'acide chlorhydrique. Une odeur forte et caractéristique s'est développée quand on a ajouté l'acide. L'extrait sec est délayé avec de l'eau distillée froide. La dissolution est parfois assez lente. Il reste comme produits insolubles du chlorure de plomb et une substance résineuse dont il sera question plus loin. On lave deux ou trois fois l'insoluble avec quelques centimètres cubes d'eau distillée. La solution, dont le volume est de 25 à 30 cm³, est trouble et colorée en rouge brun. Centrifugée, elle laisse seulement déposer le chlorure de plomb ; la substance résineuse reste en suspension.

C'est cette solution qui sera employée pour les essais ultérieurs. Le chlorure de plomb qui s'y trouve encore dissout ne gêne pas.

CHAPITRE IV.

Etude de la constitution du conjugué glycuronique.

§ 1. — Considérations théoriques.

Dans le chapitre précédent, j'ai montré que dans l'urine des chiens chloralosés, on peut caractériser un conjugué glycuronique, et que ce composé, séparé à l'état de sel plombique, peut être obtenu en solution aqueuse.

L'impossibilité devant laquelle je me suis trouvé d'isoler de cette solution, sous forme cristalline, soit le conjugué lui-même, soit un de ses sels, m'a conduit à en déterminer la nature exclusivement par la caractérisation de ses produits de dédoublement.

Avant d'exposer le détail de mes expériences, il importe, pour bien en saisir l'ordonnancement et pour mieux en comprendre le pourquoi, d'envisager quels sont les divers composés auxquels le chloralose peut théoriquement donner naissance dans l'organisme et, pour chacun d'eux, quels devront être les produits de dédoublement par hydrolyse *in vitro*.

Examinons successivement les 3 processus possibles (1) :

(1) Les processus réducteurs ne seront pas envisagés, car le chloralose ne paraît pas perdre son chlore dans l'organisme et ne semble pas pouvoir se réduire autrement.

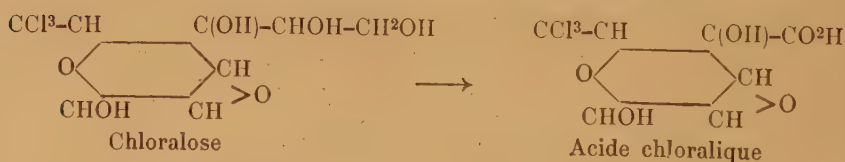
1° Décomposition du chloralose en chloral et glucose.

Ainsi que nous l'avons déjà exposé (p. 2) une telle libération du chloral dans l'organisme devrait s'accompagner de sa réduction, puis de la conjugaison glycuronique de l'alcool trichloréthylrique ainsi produit. Il se formerait, dans ces conditions, de l'*acide urochloralique*.

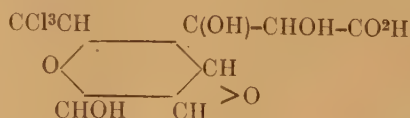
Or, par hydrolyse sulfurique, cet acide se dédouble en acide glycuronique et en alcool trichloréthylrique, facile à caractériser.

2° Oxydation de la chaîne $\text{CHOH} - \text{CH}^2\text{OH}$ du chloralose.

On sait qu'*in vitro* l'oxydation azotique et permanganique transforme le chloralose en un acide possédant un atome de carbone de moins, l'acide chloralique (1) :



On peut supposer que, dans l'organisme, l'oxydation puisse être plus ménagée et donner naissance à l'acide correspondant que j'ai proposé de désigner sous le nom d'acide chloraluronique :



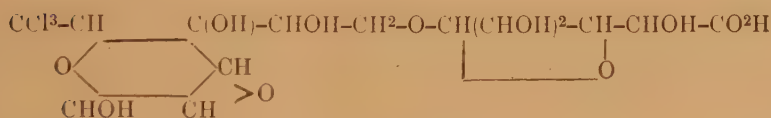
Or ces 2 acides, dont on peut admettre, en définitive, qu'ils se forment l'un et l'autre, donnent naissance par hydrolyse, d'une part, à la même copule, le chloral, et d'autre part, soit à l'acide glycuronique pour l'un, soit à l'acide $\text{C}^5\text{H}^8\text{O}^6$ pour l'autre.

(1) RICHET et HANRIOT. — *Bull. Soc. Chim.* (3), 11, 304 (1894).

Ainsi la présence du chloral parmi les produits d'hydrolyse de mes conjugués glycuroniques permettrait de supposer que ceux-ci sont constitués par l'acide chloralique ou par son homologue, l'acide chloraluronique ; nous allons voir cependant que le chloral ainsi retiré pourrait avoir une autre origine.

3^e Conjugaison glycuronique du chloralose.

Tout inattendue qu'elle soit, l'hypothèse d'une conjugaison glycuronique du chloralose avec formation d'acide chloraloseglycuronique



mériterait d'être prise en considération.

Outre le cas de la phloridzine, dont je n'eus connaissance qu'après avoir terminé mes recherches, on connaissait certains dérivés, tel que le propylglycol dissymétrique qui se transforme dans l'organisme en conjugué glycuronique et non pas par oxydation ou destruction en l'acide correspondant ou en acide de dégradation.

Or, si une pareille conjugaison devait se produire pour le chloralose, l'hydrolyse de l'acide chloralose glycuronique ainsi formé, devrait conduire, d'une part, comme dans tous les cas envisagés, à de l'acide glycuronique facilement caractérisable, d'autre part à un composé tout différent de ceux qu'on obtient dans les autres cas examinés ci-dessus, *au chloralose* lui-même. Si donc la solution aqueuse du conjugué glycuronique que j'ai obtenu, après hydrolyse acide, peut fournir du chloralose, c'est qu'il s'agissait d'un composé glycuronique du chloralose lui-même. Toutefois, il est évident que dans ce cas le chloralose pourra être

accompagné de son propre produit d'hydrolyse, le chloral, de sorte, qu'ainsi que je l'ai exposé ci-dessus, la présence de ce dernier ne saurait nullement être une preuve décisive en faveur de la deuxième hypothèse formulée plus haut. Bien plus, le dosage du glucose après précipitation de l'acide glycuronique permettrait de décider si glucose et chloral sont en proportions équimoléculaires, ce qui serait la preuve décisive que l'un et l'autre proviennent exclusivement de l'hydrolyse du chloralose.

Passons maintenant à l'exposé des recherches qui nous permettent de décider entre ces diverses hypothèses.

§ 2 — Etude des produits de dédoublement du conjugué glycuronique.

Le conjugué glycuronique dont j'ai démontré l'existence dans le chapitre précédent, a été isolé ainsi qu'il a été décrit à l'état de sel de plomb. L'étude des produits de dédoublement de ce conjugué comprendra donc 3 opérations : a) Préparation à partir des précipités plombiques de solutions purifiées de l'acide conjugué, b) Etude des conditions propices pour l'hydrolyse ; c) Hydrolyse et caractérisation des produits obtenus.

a) *Préparation de solutions purifiées du conjugué.*

Les solutions du conjugué glycuronique, qu'elles proviennent du précipité au sous-acétate de plomb ou de celui à l'ammoniaque, sont trop colorées pour qu'elles puissent être observées directement au polarimètre.

Pour les décolorer, il faut les traiter par un excès de sous-acétate de plomb. Il est avantageux, pour bien se rendre compte de l'action de ce réactif, de n'en ajouter d'abord qu'une quantité insuffisante et de centrifuger aus-

sitôt le liquide. Dans celui-ci, parfois trouble et d'aspect laiteux, lorsqu'il vient d'être séparé du précipité, on ajoute un excès de sous-acétate et on conserve en flacon bouché. Au bout de quelques instants, on voit apparaître des flocons blancs qui après quelques heures, forment une couche au fond du flacon. On centrifuge au bout de 12 heures et on s'assure qu'une nouvelle addition de réactif ne produit plus aucun louche dans le liquide limpide.

Le second précipité dissous dans l'acide chlorhydrique donne une solution qui peut parfois, sans traitement préalable, être observée au polarimètre. Si on ne faisait pas cette précipitation fractionnée du produit actif, il serait à peu près impossible de l'étudier.

On ne peut pas indiquer d'une façon précise quand il faut cesser la première addition de sous-acétate. On pourra se guider sur le changement de réaction du liquide. La solution est acide au tournesol, c'est une acidité à la fois organique et minérale, car il reste toujours une trace de HCl libre. Le sous-acétate, étant alcalin, neutralise la liqueur et, si l'addition est faite lentement, en s'assurant souvent de la réaction au papier de tournesol, on peut saisir l'instant où la réaction devient neutre ou un peu alcaline. A ce moment, on centrifuge, et dans le liquide plus ou moins limpide on ajoute quelques gouttes de sous-acétate. S'il ne se produit plus qu'un précipité bien blanc, on décante dans un flacon et on ajoute largement du sous-acétate.

On peut encore, la solution à précipiter étant mise dans un verre, verser le sous-acétate par petites portions en agitant soigneusement. Les premières additions produisent des précipités très bruns. Lorsqu'en faisant couler le réactif le long des parois du verre, on voit se former au milieu du précipité plus ou moins coloré, des traînées blanches, on centrifuge aussitôt.

Premier traitement par le sous-acétate de plomb. —

Le précipité obtenu en premier lieu est lavé par centrifugation, puis avec un mélange d'éther et d'alcool pour dissoudre toute la matière résineuse. En employant l'alcool seul, la centrifugation se fait généralement très mal. Par évaporation, les liquides éthéro-alcooliques abandonnent cette substance sous la forme d'un vernis rouge brun. En faisant bouillir quelques centimètres cubes d'une solution alcoolique de ce résidu avec de l'eau pour chasser tout l'alcool, on obtient une espèce d'émulsion qui réduit énergiquement le réactif cupro-potassique. La solution alcoolique n'étant décolorée suffisamment, ni par le sous-acétate, ni par le noir animal, on ne peut pas faire d'observations polarimétriques, avec une concentration suffisante. Il n'est donc pas possible de savoir si elle a une action sur la lumière polarisée.

Le précipité plombique lavé à l'alcool éther est dissous dans l'acide chlorhydrique. La solution, souvent très colorée, doit être traitée par le noir animal, puis très étendue, pour pouvoir être examinée au polarimètre.

Avec presque toutes ces solutions, j'ai observé des déviations gauches toujours très faibles, quelquefois même nulles ; dans un cas, nous avons vu une déviation droite. Cette dernière constatation est intéressante, parce qu'elle semble indiquer que l'acide glycuronique qui se trouve à l'état libre précipite tout d'abord.

L'action sur le réactif cupropotassique est, elle aussi, assez variable, j'ai eu des réductions nettes le plus souvent ; mais, certaines fois, je n'ai pas obtenu la plus faible réduction. Cela ne doit pas surprendre, puisque le premier précipité peut n'être formé que de chlorure de plomb et des combinaisons plombiques des matières colorantes. En définitive, je n'ai pas poursuivi l'étude des solutions ainsi obtenues, qui conduisent à des résultats imprécis mais je me suis adressé au deuxième précipité qui est beaucoup plus pur.

Deuxième traitement par le sous-acétate de plomb. —

Le deuxième traitement par le sous-acétate de plomb fournit un précipité et un liquide que j'ai nettement examinés. Le précipité, peu coloré, quelquefois même bien blanc, est lavé par centrifugation avec de l'eau ; mais, au deuxième ou troisième lavage, la centrifugation devient difficile. On continue alors les lavages avec de l'alcool et de l'éther.

Le tube est rempli à moitié avec de l'alcool à 95° et le précipité délayé avec un agitateur. On bouche le tube et on agite vigoureusement pour bien diviser le précipité. On achève de remplir avec de l'éther et on agite encore pour mélanger le liquide. On fait ainsi 4 à 5 lavages.

Le mélange éthéro-alcoolique étant un bon dissolvant du chloralose enlève les moindres traces de ce corps qui pourraient se trouver dans le précipité. On étale la pâte fluide qui se trouve au fond des tubes, sur les parois, en se servant d'un agitateur. On abandonne quelques heures dans un endroit tiède pour évaporer l'éther. On verse ensuite dans les tubes à centrifuger quelques centimètres cubes d'eau et autant d'acide chlorhydrique. On refroidit sous un filet d'eau, pendant qu'on mélange avec l'agitateur. On reconnaît que la dissolution est terminée quand le précipité n'adhère plus au verre, qu'il se dépose rapidement. C'est alors uniquement du chlorure de plomb.

On ajoute ensuite de l'eau distillée, on mélange et on centrifuge. La solution, dont le volume est de 25 à 30 cm³, est souvent observable au polarimètre sans grande dilution, ou traitement avec beaucoup de noir animal.

Elle dévie toujours à gauche et réduit lentement le réactif cupropotassique. Nous la désignerons désormais sous le nom de solution A.

b) Le liquide qui surnage le deuxième précipité n'est pas trop coloré pour pouvoir être examiné au polarimètre. Il

dévie à gauche et réduit le réactif cupropotassique après une longue ébullition. Additionné d'ammoniaque et conservé 12 heures en flacon bouché, il donne un précipité qui, centrifugé et lavé au mélange éthéro-alcoolique, puis mis en solution dans l'acide chlorhydrique, fournit une solution (solution B) déviant à gauche et réduisant lentement le réactif cupropotassique.

Le liquide ammoniacal séparé du précipité, examiné au polarimètre, est dextrogyre ou inactif. On l'agite avec son volume d'éther acétique qu'on lave ensuite une ou deux fois avec un peu d'eau distillée pour enlever les traces de solution ammoniacale entraînées. On sèche sur le sulfate de soude anhydre et on évapore l'éther acétique dans le vide sulfurique. On obtient ainsi quelques centigrammes d'un corps blanc cristallisé qui est du *chloralose*. On le caractérise ainsi :

1° Son point de fusion, déterminé au bain de mercure, est voisin de 180° à 181°, qui est celui du chloralose qui a servi aux expériences pris dans les mêmes conditions.

2° Quelques milligrammes, mis en solution dans deux ou trois centimètres cubes d'eau distillée, sont fortement agités avec quelques gouttes d'une solution concentrée de soude et une gouttelette de chlorure de benzoyle. Quand celui-ci a disparu, il apparaît des cristaux de benzoylechloralose qui montent à la surface du liquide. La liqueur, bien entendue, doit être restée alcaline (Réaction très sensible).

3° Une solution de quelques milligrammes est divisée en deux parties. Dans la première, on ajoute de l'acide azotique et du nitrate d'argent ; il ne se forme pas de précipité. L'autre partie est évaporée au bain-marie avec 3 ou 4 gouttes de solution de soude exempte de chlorure. Le résidu sec, repris par l'eau, acidulé par l'acide azotique et additionné de nitrate d'argent, donne un précipité de chlorure d'argent.

4° On fait bouillir, pendant plusieurs minutes, quelques parcelles du corps à identifier avec un ou deux centimètres cubes de réactif cupropotassique. On laisse reposer. Au bout d'une heure, on trouve, au fond du tube à essai, un peu d'oxydule de cuivre (Réaction peu sensible).

5° Deux centimètres cubes d'une solution au millième, injectés à une souris, produisent toutes les réactions physiologiques du chloralose pur.

Comparaison entre les solutions obtenues et les urines dont elles dérivent.— Les solutions du conjugué glycuonique se comportent exactement comme les urines d'où elles proviennent. Le sous-acétate de plomb ne précipite le glycuonique que partiellement. Il en reste des quantités importantes dans les solutions séparées du précipité plombique. Celles-ci, additionnées d'une quantité suffisante d'ammoniaque, deviennent dextrogyres ou inactives; mais, même quand elles sont inactives, elles cèdent du chloralose, corps dextrogyre, à l'éther acétique; il faut donc qu'il y reste encore des corps lévogyres qui annulent l'action dextrogyre du chloralose.

Dans l'urine, le chloralose provient de l'élimination urinaire, tandis que le chloralose isolé des solutions provient de la décomposition d'un peu du glycuonique pendant l'évaporation dans le vide des solutions chlorhydriques.

En effet, les précipités plombiques ou ammoniacaux qui ont servi à préparer ces solutions, lavés très soigneusement, ne contenaient plus de chloralose. Délayés dans l'alcool et laissés en contact pendant plusieurs heures, ils ne cédaient pas à ce liquide la plus légère trace de produit cristallisé. Au fond des vases, où l'évaporation de l'alcool bien filtré avait été faite, on ne trouvait que quelques milligrammes d'une poudre blanche qui, touchée avec un agitateur trempé dans une solution d'iodure de potassium, prenait une coloration jaune. C'était donc un sel de plomb.

**Tableau II. — Etude du précipité produit dans l'urine des animaux chloralosés
par le sous-acétate de plomb.**

100 cm³ du précipité obtenu directement de l'urine d'un animal chloralosé et traité, comme il a été dit précédemment, par l'acide chlorhydrique, ont fourni la solution étudiée dans le tableau ci-dessous.

SOLUTION contenant beaucoup de subst. résineuse. Volume 30 cm³. Acidité min. faible. On fait deux précipitations successives : l'une, avec 15 cm³ d'extrait de Saturne, fournit un 1^{er} précipité ; l'autre, par addition au filtrat de 20 nouveaux cm³ du même réactif ; formation d'un 2^e précipité qu'on sépare après 12 heures de repos.	1^{er} et 2^e PRÉCIPITÉS.	1^{er} PRÉCIPITÉ. — Après lavage avec mélange éthero-alcoolique et centrifugation, on le dissout dans l'acide chlorhydrique; on centrifuge. 2^e PRÉCIPITÉ. — Traité comme le 1^{er}, donne :	PRÉCIPITÉ. — Chlorure de plomb. SOLUTION. — Très colorée. Diluée jusqu'à vision, ne donne rien avec le réactif euprototassique. Déviation polarimétrique légèrement <i>droite</i>.
SOLUTION Peu colorée. Déviation : — 22 minutes. Réduit lentement liqueur de Violette. Elle est additionnée de 6 cent. cubes ammoniaque pure et centrifugée après 12 heures de repos.		PRÉCIPITÉ. — Chlorure de plomb. SOLUTION. — Volume 30 cm³. Très colorée, doit être très étendue. On a alors : Déviation polarimétrique : — 14 minutes. Réduction lente de la liqueur de Violette (<i>Solution A</i>). SOLUTION. — Elle n'a pas de pouvoir rotatoire. Epuisée par éther acétique, elle donne 3 centigr. de chloralose. Point de fusion 180-181°.	PRÉCIPITÉ. — Chlorure de plomb. SOLUTION. — Volume 40 cent. cubes, colorée, mais observation au polarimètre assez facile. Déviation : — 14 minutes. Réduction lente de la liqueur de Violette (<i>Solution B</i>).

Tableau III. — Etude du précipité produit par l'acétate de plomb ammoniacal dans l'urine des animaux chloralosés après séparation du précipité par le sous-acétate de plomb.

Cette étude a été effectuée successivement sur les précipités fournis par deux urines différentes ; on a ainsi obtenu deux solutions qui seront examinées dans le tableau ci-dessous : l'une (1^{re} urine) a été préparée avec un précipité pesant 20 gr. ; l'autre (2^e urine) avec un précipité pesant 15 gr.

SOLUTIONS. 1^{re} Urine. Volume 25 cm³. Verdit légèrement le violet de méthyle. Riches en substance résineuse insoluble dans l'eau. Le premier précipité est obtenu avec 15 cm³ de sous-acétate de plomb. Le second avec 20 cm³. 2^e Urine. Volume 25 cm³. Légère acidité minérale au violet de méthyle. Beaucoup plus riche que la 1^{re} en substance résineuse. Le premier précipité est obtenu avec 15 cm³ de sous-acétate. Le second avec 20 cm³. On centrifuge.	1^{ers} PRÉCIPITÉS. PRÉCIPITÉS. SOLUTIONS. 1^{re} Urine. Volume 60 cm³. Déviation : — 22 minutes. Réduction lente. 2^e Urine. Volume 60 cm³. Déviation — 16 minutes. Réduction lente. Elles sont précipitées par 6 cm³ ammoniac des réactifs. On centrifuge.	1^{re} Urine. — Solution chlorhydrique très étendue et décolorée au noir. Déviation : — 6 minutes. Réduit lentement la liqueur de Violette. 2^e Urine. — Solution chlorhydrique très colorée. Le noir est presque sans action. Très fortement diluée, paraît avoir déviation droite. Avant décoloration et dilution, lente mais forte réduction de la liqueur de Violette. 1^{re} Urine — Solution chlorhydrique ; volume = 30 cm³. Décolorée au noir. Déviation : — 52 minutes. Réduction lente de la liqueur de Violette (Solution A). 2^e Urine. — Solution chlorhydrique, doit être très diluée. Déviation : — 14 minutes. Réduction lente de la liqueur de Violette (Solution A). 1^{re} Urine. — Déviation : + 4 minutes. Chloralose extrait 3 centigr. Point de fusion 180°. 2^e Urine. — Déviation : + 4 minutes. Chloralose extrait 4 centigr. Point de fusion 180°. PRÉCIPITÉ. — Chlorure de plomb.

Remarque I. — Pour pouvoir apprécier les faibles déviations polarimétriques, il fallait conduire les traitements de façon à obtenir des solutions aussi concentrées que possible, et, par suite, des précipités ne renfermant que très peu de sels de plomb qui auraient retenu beaucoup de liquide. C'est pourquoi, dans la préparation du conjugué glycuronique, en partant des précipités plombiques de l'urine, je n'ai pas neutralisé, même très partiellement, l'acide chlorhydrique en excès. Le chlorure formé serait resté dans la liqueur concentrée et aurait exigé, pour précipiter, une certaine quantité de sous-acétate, en donnant un volumineux précipité de chlorure de plomb. J'ai donc chassé le plus possible d'acide chlorhydrique par évaporation, quelque onéreuse que soit cette opération par suite de la destruction d'une partie du glycuronique.

Remarque II. — Les quantités portées dans le tableau précédent et dans ceux qui suivront, n'ont pas été déterminées dans le but de fournir des indications rigoureusement quantitatives. Les volumes ont été mesurés à l'éprouvette graduée, les substances pesées au trébuchet ; on ne s'est astreint qu'à bien observer le sens des déviations, les vitesses de réduction, et à caractériser très rigoureusement les corps isolés.

b) **Etude des meilleures conditions d'hydrolyse.**

Toutes les solutions dont je viens d'indiquer la préparation étant lévogyres et réduisant lentement le réactif cupropotassique, il suffira, pour pouvoir affirmer qu'elles renferment un conjugué glycuronique, de constater qu'après hydrolyse au moyen d'un acide minéral, elles réduisent ce réactif et qu'elles dévient à droite. Enfin, le con-

jugué glycuronique sera caractérisé si on parvient à isoler *en nature* le corps uni à l'acide glycuronique.

Ce procédé, simple en théorie, ne laisse pas de présenter dans la pratique de très grosses difficultés, quand la molécule combinée à l'acide glycuronique peut elle-même être scindée, par hydrolyse, en molécules plus simples qu'il n'est pas toujours possible d'isoler en nature.

Si nous examinons le cas du conjugué glycuronique qui serait formé par l'union d'une molécule d'acide glycuronique avec une molécule de chloralose, on voit de suite que trois corps peuvent se former par une hydrolyse trop énergique.

Le chloralose formé par l'union d'une molécule de chloral et de glucose est dédoublé à chaud en ses composants par des solutions d'acides minéraux suffisamment concentrées.

L'hydrolyse du glycuronique, effectuée avec un acide trop concentré, à une température trop élevée, donnera les corps suivants : *chloral, glucose, acide glycuronique*.

Il faut donc, avant toute chose, déterminer dans quelles conditions de température et d'acidité il convient de faire l'hydrolyse du glycuronique pour le scinder seulement en deux molécules : *chloralose et acide glycuronique*.

D'après PETIT et POLONOWSKI (1), l'acide sulfurique à 20 % dédouble complètement, à l'ébullition en 2 ou 3 heures, le chloralose en chloral et glucose.

HANRIOT et RICHET (2) ont retrouvé intégralement 5 grammes de chloralose ayant bouilli 3 heures 1/2 avec 1 litre d'eau et 5 grammes d'acide sulfurique. Ils ont obtenu à peu près les mêmes résultats avec un acide à 10 grammes par litre et un autre à 50 grammes. Dans le cas le plus défavorable, il n'y a eu qu'une perte de 0 gr. 50 sur les 5 grammes employés.

(1) *B. Soc. Chim.*, 3^e série T. XI, p. 127.

(2) *B. Soc. Chim.*, 1894, p. 304.

J'ai fait les expériences suivantes :

Une solution de glycuronique, provenant de la décomposition par la méthode classique à l'hydrogène sulfuré du précipité par le sous-acétate de plomb fut, après neutralisation et départ de l'acide sulfhydrique par longue ébullition additionnée de 1 cm³ d'acide sulfurique pour un volume de 200 cm³. Soumise à une ébullition de trois heures, avec fréquentes additions d'eau distillée, pour maintenir le volume à peu près constant ; puis, ramenée exactement au volume primitif après refroidissement, elle déviait la lumière polarisée de — 14 minutes. Après acidulation et avant ébullition, la déviation était de — 16 minutes. L'hydrolyse du glycuronique est à peu près nulle dans les conditions de l'essai.

Une solution de chloralose (0,50 centigr. dans 200 cm³ d'eau distillée), traitée exactement de la même façon, dégage, pendant l'ébullition, une faible odeur de chloral. Epuisée par l'éther acétique, elle cède à ce solvant du chloralose fondant au même point que l'échantillon où il a été prélevé. La faible odeur de chloral indique cependant qu'il y a un peu de chloralose hydrolysé.

L'ébullition à la pression ordinaire en milieu faiblement acide n'étant pas suffisante pour hydrolyser le conjugué glycuronique, j'ai chauffé le chloralose en solution aqueuse acide à une température supérieure à 100° afin de voir si dans ces nouvelles conditions il est dédoublé. Ce procédé d'hydrolyse a déjà servi à Paul MAYER et NEUBERG (1) pour décomposer l'acide urochloralique.

10 centigr. de chloralose furent introduits dans un tube de verre avec 20 cm³ d'eau distillée acidulée par 20 gouttes (= 1 cm³) d'acide chlorhydrique. Le tube scellé, enfermé dans une gaine de fer, fut chauffé dans un bain d'huile vertical, pendant 7 heures, à une température voisine de 130°.

(1) *Zeits. f. Physiol. Ch.*, T. 29, 1900, p. 256.

La solution, refroidie, était colorée en jaune clair et avait une odeur agréable de caramel. Neutralisée exactement et étendue à 30 cm³, elle fut distillée à feu nu à la pression ordinaire, de façon à obtenir 10 à 15 cm³ de distillat.

Ce distillat, tout à fait incolore, à faible odeur de caramel, fut, pour y rechercher le chloral, réparti en quantités égales dans trois tubes à essai avec lesquels on fit les réactions suivantes :

1^{er} tube. — Le contenu, additionné d'acide azotique et de nitrate d'argent, ne donne pas de précipité de chlorure d'argent. Alcalinisé par l'ammoniaque et chauffé jusqu'à commencement d'ébullition, il prend une coloration brune.

2^e tube. — On y verse 1 ou 2 cm³ d'une solution concentrée de soude pure bien exempte de chlorure, on porte lentement à l'ébullition. On laisse refroidir et on acidule par l'acide azotique. Le nitrate d'argent produit *un abondant* précipité de chlorure d'argent.

Le chloral s'est transformé à froid, sous l'influence de la soude, en formiate et chloroforme qui, à chaud, s'est décomposé en donnant du formiate et du chlorure de sodium.

3^e tube. — On ajoute la même quantité de soude que dans le 2^e tube. On laisse quelques minutes en contact. Le chloral se transforme, à froid, en formiate et chloroforme. On acidule par l'acide nitrique en refroidissant sous un filet d'eau. On verse du nitrate d'argent ; on n'obtient qu'un très léger louche et même, lorsqu'on a bien refroidi, le contenu du tube reste limpide.

Les deux dernières réactions et l'absence de précipité par le nitrate d'argent dans le 1^{er} tube, caractérisent le chloral, ou, ce qui revient au même, son produit de transformation : le chloroforme.

La coloration brune produite par l'ammoniaque a beaucoup moins d'importance, parce qu'il y a toujours, dans le distillat, entraînement d'un peu de matières organiques volatiles qui, dans le cas présent, est révélé par la faible odeur de caramel.

Disons de suite, pour ne pas avoir à y revenir, que lorsqu'on opère avec les solutions de conjugués glycuroniques, la quantité de matières organiques volatiles est un peu plus abondante. La solution alcaline, chauffée pour décomposer le chloroforme, prend une belle coloration jaune qui disparaît quand on ajoute de l'acide nitrique.

Le liquide qui n'a pas distillé est déféqué par le sous-acétate de plomb. Sa déviation polarimétrique est de $+8$ minutes. L'éther acétique ne lui enlève que fort peu d'un produit blanc cristallisé, paraissant fondre à 212° et se sublimant déjà par chauffage lent vers 180° . Le chloralose a donc été détruit.

J'ai refait une nouvelle expérience avec une solution aqueuse de chloralose de même volume et de même concentration.

L'acidité en a été diminuée d'environ 4 fois. J'ai acidulé avec cinq gouttes d'acide chlorhydrique correspondant sensiblement à 0 cm³ 25. Cette acidité est nettement indiquée par le papier au violet de méthyle préparé comme je l'ai déjà dit.

La solution de chloralose, chauffée pendant 5 heures entre $110-120^{\circ}$ dans le même bain d'huile que la première, n'était pas colorée. Elle n'avait qu'une faible odeur de caramel. Le distillat donnait nettement, mais faiblement, les réactions du chloral. La partie non distillée cédait à l'éther acétique du chloralose fondant à 178° au lieu de 180° . (Point de fusion du chloralose ayant servi à l'expérience, pris dans les mêmes conditions).

Une solution de chloralose de même titre que la précédente, parfaitement neutre, donne un distillat qui ne contient pas de chloral.

Dans le dernier essai d'hydrolyse du chloralose, il n'y a eu qu'une quantité très minime de chloralose décomposé. C'est donc dans ces mêmes conditions de température et d'acidité que j'ai pratiqué l'hydrolyse des solutions des glycuroniques.

J'ai obtenu, comme on le verra plus loin, d'excellents résultats.

c) Hydrolyse des solutions.

Les liqueurs désignées dans les deux derniers tableaux sous les dénominations de solutions A et B, sont évaporées à sec dans le vide en présence de chaux et d'acide sulfurique, comme on l'a déjà fait pour les solutions primitives.

Le résidu sec est dissous dans 20 cm³ d'eau distillée et acidulé par l'acide chlorhydrique jusqu'à virage bleu du papier au violet de méthyle, en opérant exactement comme il a été décrit pour l'hydrolyse des solutions de chloralose. On met ensuite la solution acidulée en tube scellé et on la chauffe 4 ou 5 heures au bain d'huile entre 110°-120°.

La solution hydrolysée est alors neutralisée presque complètement avec de la soude et on termine avec un peu de carbonate de chaux, afin d'avoir une neutralisation parfaite.

La solution étendue au volume de 30 cm³ est distillée ; on recueille environ 10 cm³ de distillat et on y caractérise le chloral, comme on l'a déjà indiqué. Le liquide qui n'a pas distillé est trop coloré pour se prêter aux observations polarimétriques. Il faut donc le décolorer sans précipiter l'acide glycuronique qu'il renferme, ce qui exclue l'emploi du sous-acétate de plomb.

J'ai utilisé avec succès l'acétate neutre de plomb en solution à 20 ‰, additionné de quelques gouttes d'acide acétique, pour donner une très faible acidité au tournesol ; car l'acétate neutre de plomb contient parfois une trace de sous-acétate de plomb.

Pour obtenir une bonne décoloration, il faut en employer de 5 à 8 cm³ par 20 cm³ de liquide à décolorer. On constate que la solution ainsi décolorée dévie à droite et réduit instantanément à l'ébullition la liqueur de Violette. Additionnée d'un excès de sous-acétate (15 à 20 cm³) et abandonnée en flacon bouché pendant 12 heures, elle donne un abondant précipité. Le liquide, séparé du précipité par centrifugation, est déféqué par quelques centimètres cubes d'ammoniaque, qui produit un précipité entraînant encore un peu de matières colorantes. Elle dévie très légèrement à droite. On épuise avec de l'éther acétique dont l'évaporation dans le vide sulfurique laisse du chloralose.

Caractérisation du chloralose. — J'ai déjà décrit en détail les procédés d'extraction et les réactions à employer pour caractériser chimiquement le chloralose.

Il me reste à donner quelques détails sur la caractérisation physiologique de cette substance non seulement sur le produit régénéré et cristallisé, mais encore sur les solutions de conjugué glycuronique avant et après hydrolyse. MM. REGNIER et TIFFENEAU (1) ont montré que la souris se prête parfaitement à la caractérisation des petites doses de chloralose ; en effet, on observe avec cet animal, outre le cortège bien connu des troubles moteurs, des oscillations latérales typiques et de la rotation longitudinale (type cérébelleux moyen). Les mêmes auteurs ont fixé les doses efficaces qui, pour des souris de 20 gr. environ, sont de 0,0005 (dose active), à 0,002 (dose toxique).

a) *Essai sur la souris avec le chloralose régénéré et cristallisé.* — Dans les essais que j'ai faits avec le chloralose que j'avais régénéré et isolé à l'état cristallisé, j'ai toujours injecté par voie sous-cutanée des doses de 1 mgr. pour des souris de 20 gr. Avec la dose de 1 mgr. j'ai toujours obtenu très nettement les troubles moteurs, affais-

(1) REGNIER et TIFFENEAU. — *C. R. Soc. Biol.* (1913) 74, p. 874.

sement plus ou moins marqué des 4 membres, reptation, titubation, incoordination motrice. Avec les doses de 1 mgr. 5, j'ai observé des périodes d'oscillation latérale, plus ou moins prolongées et assez souvent de la rotation longitudinale, celle-ci étant toujours d'assez courte durée. En même temps on peut observer l'hyperexcitabilité médullaire, et bientôt les convulsions apparaissaient avec trémulations des membres et des secousses très caractéristiques de la queue.

b) *Essais sur les solutions de conjugué glycuronique avant et après hydrolyse.* — La solution de conjugué que j'ai étudiée provenait de 5 gr. de précipité par l'acétate de plomb ammoniacal que j'avais décomposé par H^2S , avec emploi de magnésie pour neutraliser, celle-ci étant ensuite éliminée par le carbonate de soude. La solution ainsi obtenue (40 cm^3) avait une déviation de $-48'$. Une partie de cette solution a été hydrolysée par chauffage de 4 heures à 120° avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique ; on neutralise ; 1 cm^3 du liquide neutre correspond à 0cc. 82 de la solution avant l'hydrolyse ; la déviation est devenue $+34'$; le liquide est coloré.

Deux souris de 20 gr. environ ont reçu, l'une 2 cm^3 , l'autre 3 cm^3 de la solution avant l'hydrolyse ; je n'ai observé aucune sorte de troubles. Deux autres souris de même poids ont reçu l'une 1 cm^3 de la solution hydrolysée, l'autre 2 cm^3 de la même solution. Déjà, après dix minutes, on commence à observer chez l'une et chez l'autre des troubles moteurs, puis bientôt de la reptation et des phénomènes d'incoordination ; de plus, la première souris a présenté nettement de la rotation longitudinale. Après 20 à 30 minutes, l'une et l'autre ont été prises de convulsions et la mort (arrêt respiratoire et disparition des réflexes) est survenue après une heure environ ; à ce moment le cœur battait encore. La solution hydrolysée con-

tenait donc environ 1 à 2 mgr. de chloralose par cm^3 , tandis que la solution non hydrolysée n'a produit absolument aucun effet.

Caractérisation de l'acide glycuronique. — Le précipité produit par le sous-acétate est lavé par centrifugation d'abord avec de l'eau distillée, puis avec le mélange éthéro-alcoolique parce que le précipité gélatineux ne se dépose plus quand on le lave avec de l'eau. Le précipité n'est pas homogène. Il est composé d'une partie gélatineuse et d'une autre formée de grains jaunes très durs. La première partie se dissout bien dans l'acide chlorhydrique; la seconde, au contraire, doit être broyée finement au mortier avec de l'acide.

La solution chlorhydrique ainsi obtenue présente toutes les réactions de l'acide glycuronique :

1° Elle réduit immédiatement à l'ébullition la liqueur de Violette.

2° Quelques centimètres cubes additionnés d'au moins leur volume d'acide chlorhydrique et de 3 ou 4 centig. de phloroglucine, chauffés doucement, donne une belle coloration rouge. L'alcool amylique dissout cette matière colorante, en se colorant en rouge cerise quand on l'agite avec le liquide froid.

3° En remplaçant la phloroglucine par l'orcine, on obtient, en chauffant lentement au bain-marie, une belle coloration bleu violet (1), qui, examiné de suite au spectroscope, montre une bande noire entre C et D. Elle passe assez rapidement au vert, puis dépose des flocons noirs.

4° La solution dévie à droite.

(1) La plupart des solutions d'acide glycuronique donnent d'abord cette coloration, mais celles qui sont légèrement colorées en jaune ne donnent que la coloration verte. Cette teinte serait due à la présence du fer (Bertrand et Thomas, Guide pour manip. de Ch. Biol., p. 65).

5° Réaction à la naphto-résorcine (1) (Dioxynaphtaline 1, 3). J'ai suivi la technique de GRIMBERT. A 5 cm³ de la solution, on ajoute 1 cm³ de solution alcoolique de naphto-résorcine à 1⁰/₀ et 5 cm³ d'acide chlorhydrique concentré. On porte le tout au bain-marie bouillant pendant 5 minutes, et, après refroidissement, on agite le mélange avec 5 cm³ d'éther, qui se colore en rouge violet foncé, et donne au spectroscope une bande d'absorption correspondant à la raie D.

Nous allons résumer dans plusieurs tableaux les résultats obtenus en hydrolysant les solutions précédentes.

(1) A. TOLLENS. — *Über einen einfachen Nachweis der Glucuronsäure mittels Naphthoresorcin Salzsäure und Ather* D. ch. Ges. 1908, 41, p. 1789.

Tableau IV. — Hydrolyse de la solution A provenant du Tableau II.

SOLUTION A. Elle est évaporée à sec dans le vide. Le résidu est repris par 20 cm³ d'eau distillée. On ajoute avec 5 gouttes d'acide chlorhydrique, puis chauffage 4 heures entre 110 et 120°. On neutralise. On distille après avoir ajouté 10 cm³ d'eau distillée.	LIQUIDE RÉSIDUEL. Il est neutralisé, puis déféqué avec 5 cm³ acétate neutre de plomb à 20 0/0. On centrifuge.	PRÉCIPITÉ. — Très peu abondant.	SOLUTION après défécation par l'ammoniaque (6 cent. cub.) Elle dévie de + 4 minutes. Elle cède du chloralose à l'éther acétique. Poids = 3 centig. Point de fusion 180°.	SOLUTION. Déviation + 14 minutes. Réduction instantanée à l'ébullition de la liqueur de Violette. Traité par excès de sous-acétate, elle est ensuite centrifugée. (Présence d'acide glycuronique dextrogyre immédiatement réducteur, et précipitable par extrait de Saturne).	PRÉCIPITÉ. — Précipité. Lavé à l'eau, puis au mélange éther alcool, il est dissous dans HCl et centrifugé. (Glycuronate de Pb). PRÉCIPITÉ. — Chlorure de plomb. SOLUTION. — Volume 25 cm³. Déviation de + 12 minutes. Réduit la liqueur de Violette. Donne toutes les réactions de l'acide glycuronique.
--	---	--	---	--	---

Tableau V. — Hydrolyse de la solution B provenant du tableau II.

LIQUIDE DISTILLÉ. — Renferme un peu de chloral.			
SOLUTION B. Elle est évaporée à sec dans le vide. Le résidu est repris par 20 cm³ d'eau distillée. On l'acidule avec 5 gouttes d'acide chlorhydrique et on chauffe entre 110 et 120°. On neutralise, on distille après avoir ajouté 10 cm³ d'eau distillée.	LIQUIDE RÉSIDUEL. Il est neutralisé, puis défilé avec 5 cm³ d'acétate neutre de plomb à 20 0/0. On centrifuge.	PRÉCIPITÉ. — Peu abondant.	SOLUTION après défécation par l'ammoniaque (6 cent. cubes). Elle dévie de + 4 minutes. Elle cède du chloralose à l'éther acétique. Poids = 3 centigr. Point de fusion 178° (Le chloralose est un peu coloré).
	SOLUTION. Déviation : + 14 minutes. Réduction instantanée de la liqueur de Violette. Traitée par excès de sous-acétate, elle est ensuite centrifugée. Présence d'acide glycuronique, immédiatement réducteur et précipitable par extrait de Saturne.	PRÉCIPITÉ. Lavé à l'eau, puis au mélange éther alcool, il est dissous dans HCl concentré. (Glycurodate de Pb.)	PRÉCIPITÉ. — Chlorure de plomb. SOLUTION. — Volume 25 cm³. Déviation : + 10 minutes. Réduit instantanément la liqueur de Violette. Donne toutes les réactions de l'acide glycuronique.

Tableau VI. — Hydrolyse des solutions A du tableau III, préparées avec les précipités ammoniacaux.

DISTILLAT. — Il renferme un peu de chloral.

SOLUTIONS A.

Elles sont évaporées à sec dans le vide.

Dissoudre ensuite dans 20 cm³ d'eau distillé.

On acidule par l'acide chlorhydrique jusqu'à bleuissement du papier au violet de méthyle.

1^{re} Urine. — Il en faut 8 gouttes.

2^e Urine. — Il en faut 6 gouttes.

Chauffage en tube scellé à 110-120° pendant 4 à 5 heures.

On neutralise et on distille après addition de 10 cm³ d'eau.

LIQIDE RÉSIDUEL

On le défèque avec de l'acétate neutre de plomb à 20 % (5 à 8 cm³).

On centrifuge.

PRÉCIPITÉS. — Très faibles.

SOLUTION. — Elles sont déféquées avec 6 cent. cub. d'ammoniaque.

1^{re} Urine. — Déviation + 6 minutes.

Chloralose extrait par l'éther₃ acétique 9 centig.

Point de fusion 180°.

2^e Urine. — Déviation + 4 minutes.

Chloralose extrait 3 centig. (il y a eu des pertes).

Point de fusion 180°.

PRÉCIPITÉS
Chlorure de plomb.

SOLUTIONS.

1^{re} Urine. — Volume 25 cm³.

Déviation + 8 minutes. Réduit de suite à l'ébullition la liqueur de Violette. Elle donne toutes les réactions de l'acide glycyronique.

2^e Urine. — Volume 25 cm³.

Déviation + 8 minutes. Elle a toutes les propriétés de la précédente.

PRÉCIPITÉS.

Ils sont dissous après lavage à l'eau et au mélange éthero-alcoolique dans l'acide chlorhydrique étendu, puis on centrifuge.

On précipite les solutions par le sous-acétate de plomb.

On centrifuge après repos de 12 heures.

(Présence d'acide glycyronique.

Tableau VII. — Hydrolyse des solutions B du tableau III, préparées avec les précipités ammoniacaux.

DISTILLAT. — On y caractérise des petites quantités de chloral.

SOLUTIONS B.		Précipités. — Peu abondants.	
Elles sont évaporées à sec dans le vide, dissoutes ensuite dans 20 cm ³ d'eau.		SOLUTIONS.	
On les acidule par l'acide chlorhydrique jusqu'à blanchissement du papier de méthyl.		<i>1^{re} urine.</i> — Déviation + 14 minutes. Réduction instantanée de la liqueur de Violette.	
<i>1^{re} urine.</i> — Il en faut 7 gouttes.		<i>2^e urine.</i> — Déviation + 22 minutes. Réduction instantanée de la liqueur de Violette.	
<i>2^e urine.</i> — Il en faut 6 gouttes.		On précipite par un excès de sous-acétate. On centrifuge après 12 heures de repos.	
Chauffage en tubes scellés à 110-120° pendant 4 à 5 heures.		(Présence d'acide glycuronique).	
On neutralise et on distille après avoir ajouté 10 cm ³ d'eau.		Ils sont dissous après lavages à l'eau et au mélange éther-alcoolique dans l'acide chlorhydrique étendu, puis on centrifuge.	
		Précipité	
		Chlorure de plomb.	
		SOLUTIONS.	
		<i>1^{re} urine.</i> — Volume 20 cm ³ .	
		Déviation + 4 minutes (l'attaque par HCl a été incomplète).	
		Elle réduit de suite à l'ébullition la liqueur de Violette. Elle donne toutes les réactions de l'acide glycuronique.	
		<i>2^e urine.</i> — Volume 25 cm ³ . Déviation + 10 minutes. Elle a toutes les propriétés de la précédente solution.	

(1) La déviation droite est produite par le glucose provenant du chloralose hydrolysé. Il suffit qu'il y ait un peu plus de chloralose hydrolysé pour que la déviation soit beaucoup augmentée, le chloralose n'ayant qu'un très faible pouvoir rotatoire.

§ 3.— Destinée du chloralose dans l'organisme et ses rapports avec la conjugaison glycuronique.

Élimination urinaire du chloralose. — J'ai montré, dans le paragraphe précédent, que le conjugué glycuronique isolé par moi de l'urine des chiens chloralosés est l'acide chloralose glycuronique; d'autre part, j'ai pu avant tout traitement, extraire directement des mêmes urines du chloralose en nature qui a été caractérisé à la fois par ses constantes physiques et par ses réactions physiologiques. Il en résulte que l'élimination du chloralose se fait en partie à l'état de chloralose, en partie, à l'état d'acide glycuronique; les expériences IX et X montrent que chez certains chiens l'élimination du chloralose en nature peut être prépondérante, tandis que, dans la plupart des autres cas, c'est la formation du glycuronique qui l'emporte.

Cette particularité constitue vraisemblablement un caractère individuel, car le chien des expériences IX et X était impuissant à conjuguer, en quantité notable, des composés comme le menthol, ou le phénoxypropane diol dont on sait, et dont je me suis assuré, qu'avec d'autres animaux, la conjugaison glycuronique est toujours très notable.

Il existe donc des particularités individuelles; dont jusqu'ici les auteurs ne semblent pas toujours s'être préoccupés, et dont il me paraît indispensable de tenir compte dans les recherches qui seront faites sur cette question, spécialement lorsqu'on se proposera de comparer les rendements en glycuroniques de divers animaux.

Mode d'enchaînement du groupe glycuronique dans l'acide chloralose glycuronique.

Dans les paragraphes précédents, je me suis attaché à fixer la nature du conjugué glycuronique de l'urine des chiens chloralosés, en caractérisant ses deux produits de dédoublement: chloralose et acide glycuronique.

Il reste à examiner en quel point du chloralose se fait la conjugaison glycuronique et quel est le mode d'enchaînement.

La première question ne saurait être résolue expérimentalement ; d'ailleurs la structure du chloralose, elle-même, n'est pas établie avec une rigueur absolue. Ce qu'on peut affirmer à la suite des travaux de HANRIOT et KLING, c'est qu'il existe dans le chloralose, comme dans tous les glucosides, une chaîne terminale $\text{CHOH} - \text{CH}^2\text{OH}$; mais on ne connaît ni la nature, ni la position des deux autres oxhydriles (le chloralose contient 4 oxhydriles).

C'est donc arbitrairement que dans la formule que j'ai donnée de l'acide chloralose glycuronique (voir ci-dessous), j'ai admis que l'enchaînement se fait par le groupe alcool primaire.

Quant au mode d'enchaînement, le facile dédoublement par les acides dilués permet de conclure qu'il s'agit d'une liaison glucosidique.

En définitive, la formation d'acide chloralose glycuronique constitue un simple phénomène de conjugaison glycuronique, comme celui qu'on observe avec tous les composés à fonction alcoolique. Par lui-même, cet enchaînement ne présente donc aucun caractère particulier.

Le seul point digne de remarque, dans la destinée du chloralose, reste donc ce fait, que la chaîne terminale $-\text{CHOH} - \text{CH}^2\text{OH}$ de ce composé ne peut pas être oxydée en $\text{CHOH} - \text{CO}^2\text{H}$, comme cela se passe pour la plupart des glucosides (voir chapitre I). Nous allons voir quelles conséquences on en peut tirer, au point de vue du mécanisme de la conjugaison glycuronique.

Mécanisme de la formation de l'acide chloralose glycuronique et de la conjugaison glycuronique en général.

Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer la formation des conjugués glycuroniques : la conjugaison

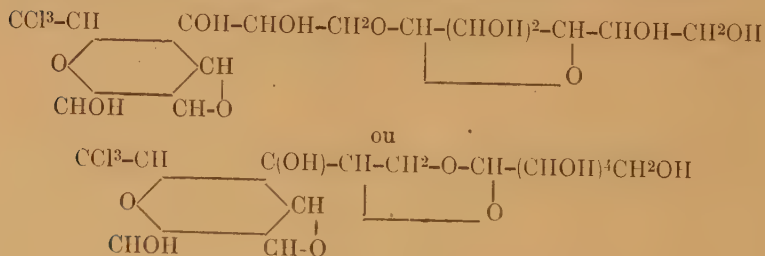
directe par union de la copule avec l'acide glycuronique la conjugaison indirecte par glucosidification de la copule et oxydation ultérieure du glucoside formé. Ces deux hypothèses pourraient être appliquées, l'une et l'autre, au cas du chloralose.

A la formation d'acide chloralose glycuronique par conjugaison directe, on ne peut faire qu'une seule objection, c'est qu'un fait analogue n'a jamais été observé jusqu'ici.

Avec la phloridzine elle-même, dont on sait qu'elle a une destinée identique à celle du chloralose, l'enchaînement a lieu par une fonction phénol libre de la copule, tandis qu'avec le chloralose, c'est par une fonction alcool du reste glucosique que se fait l'enchaînement.

Dans le deuxième mode de conjugaison du chloralose (hypothèse de SUNDWICK-FISCHER), il y a lieu d'examiner successivement les deux temps de cette réaction.

La première phase consisterait en l'union du chloralose avec une molécule de glucose avec formation d'un composé qui ne serait autre qu'un chloralose correspondant non plus au glucose, mais à un biose tel que le maltose :



Quant à la deuxième phase, elle consisterait dans l'oxydation de la fonction alcool primaire de ce sucre. On voit qu'il reste toujours difficile d'expliquer pourquoi ce groupe alcool serait apte à s'oxyder, alors qu'un groupe alcoolique semblable ne s'oxyderait pas dans le chloralose.

D'ailleurs, la première hypothèse, celle d'une conjugaison directe est toujours passible d'une pareille objection ;

en effet, il faut, dans ce cas, expliquer l'origine de l'acide glycuronique ; or, comment considérer celui-ci comme un produit normal de l'oxydation du CH^2OH terminal de glucose, alors qu'on refuserait — à cause du cas probablement exceptionnel du chloralose et de la phloridzine — à attribuer au CH^2OH des glucosides, une aptitude à s'oxyder directement en carboxyle CO^2H .

C'est d'ailleurs cette considération qui avait conduit FISCHER et PILOTY à leur hypothèse. En effet, il est difficile de concevoir que le glucose puisse s'oxyder par un autre chaînon que son groupe CHO , alors que l'oxydation du CH^2OH d'un glucoside (c'est-à-dire un dérivé où le CHO est protégé), est une réaction normale. Tant que la question de l'origine de l'acide glycuronique n'aura pas été résolue, on ne pourra donc pas adopter, sans réserve, le mécanisme de la conjugaison par liaison directe.

Quant au mécanisme de conjugaison en deux temps, proposé par FISCHER et PILOTY, il faut convenir que le cas du chloralose, s'il n'est pas en faveur de cette hypothèse, ne saurait pas lui être rigoureusement opposé ; c'est à la même conclusion qu'arrive SCHÜLLER, lorsqu'il dit (1), à propos de la destinée de la phloridzine, que la formation d'acide phloridzine glycuronique, ne peut aucunement constituer une preuve stricte, pour ou contre la théorie de FISCHER.

On peut, néanmoins, prétendre ainsi que je l'ai dit au début de ce travail, que le mécanisme de la conjugaison glycuronique n'est pas définitivement élucidé ; seule, l'étude approfondie de la destinée dans l'organisme des différents glucosides naturels ou synthétiques permettra, quand les documents seront suffisants, de donner à cette question une solution définitive.

(1) « So liegt doch in der Bildung der Phlorhizinglukuronsäure « allein, kein stricter Beweis für oder gegen die Theorie E. Fischers, » Schüller, *loc. cit.*, p. 286.

CONCLUSIONS.

1.— Après son introduction dans l'organisme du chien, soit par la voie œsophagienne, soit par la voie intrapéritonéale, le chloralose s'élimine par l'urine, en *partie*, à l'état de chloralose non transformé qu'on peut isoler directement par épuisement à l'éther acétique, en *partie* sous forme d'un nouveau conjugué glycuronique précipitable par le sous-acétate de plomb, l'*acide chloralose glycuronique*.

2.— Pour un même mode d'introduction, le taux de chacune de ces éliminations n'est pas constant chez les divers animaux ; les variations individuelles peuvent être considérables ; tandis que certains chiens transforment une grande partie du chloralose en dérivé glycuronique, d'autres l'éliminent presque totalement en nature ; chez ces derniers, les faibles aptitudes à la conjugaison glycuronique ne se manifestent pas seulement à l'égard du chloralose, mais aussi vis-à-vis de substances qui sont réputées pour donner facilement des glycuroniques.

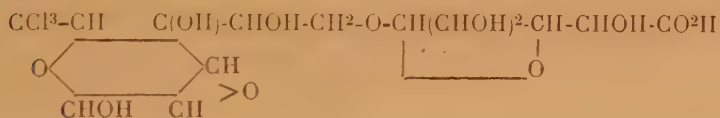
La conjugaison glycuronique dans l'organisme animal (chien) n'est donc pas seulement conditionnée par la nature de la copule introduite et par le mode d'introduction, les caractères individuels interviennent également pour une notable part.

3.— Le sous-acétate de plomb ne précipite qu'imparfaitement les conjugués glycuroniques de l'urine des ani-

maux chloralosés ; mais le sous-acétate de plomb ammoniacal en détermine la précipitation à peu près complète.

Les sels plombiques qu'on peut ainsi séparer par deux précipitations successives au moyen de ces réactifs, ne paraissent pas conduire à deux conjugués glycuroniques différents. En effet, le conjugué qu'on a régénéré d'une précipitation par le sous-acétate de plomb et qui, par conséquent, devrait être entièrement précipitable par ce réactif, ne l'est plus qu'incomplètement et ne le devient totalement que par l'acétate de plomb ammoniacal.

4.— Le conjugué glycuronique contenu dans l'urine des animaux chloralosés, est l'acide chloralose glycuronique :



Cet acide, pas plus que ses sels, n'a pu être obtenu à l'état cristallisé, mais ses produits de dédoublement, au cours de l'hydrolyse acide, ont pu être isolés et rigoureusement identifiés.

Le *chloralose*, isolé en nature, a été caractérisé à la fois par ses constantes physiques, ses réactions chimiques et ses propriétés physiologiques.

L'*acide glycuronique*, isolé à l'état de sel de plomb, a été caractérisé par son pouvoir rotatoire, ses propriétés réductrices et par ses réactions colorées.

5.— La transformation du chloralose en acide chloralose glycuronique, constitue un cas particulier de la destinée dans l'organisme animal des glucosides et composés analogues.

Seule la phloridzine se comporte de même (SCHÜLLER) ; encore avec celle-ci, la conjugaison a-t-elle lieu par une

de ses fonctions phénoliques libres, alors qu'avec le chloralose, c'est par la fonction alcool primaire que se fait l'enchaînement.

Il en résulte que dans l'organisme animal les chaînes glucosidiques ne sont pas nécessairement transformées en chaînes glycuroniques correspondantes. Toutefois, il est vraisemblable que le cas du chloralose et de la phloridzine est exceptionnel et que pour tous les autres cas cette oxydation peut être la règle, conformément à l'hypothèse de FISCHER sur le mécanisme de la conjugaison glycuronique.

Vu, bon à imprimer :

Le Président de thèse,

A. BÉHAL.

Vu :

Le Directeur de l'École,

H. GAUTIER.

Vu et permis d'imprimer :

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,

L. LIARD.

